

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

на тему **“ВПЛИВ *BIFIDOBACTERIUM LACTIS* BB12 ТА *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* GG НА ЦИТОКІНОВИЙ ПРОФІЛЬ МИШЕЙ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМИ МОДЕЛЬНИМИ ПУХЛИНАМИ”**

Виконала: студентка 2-го року навчання

Галузь знань: 09 Біологія

Спеціальність: 091 Біологія

Освітньо-наукова програма:

Лабораторна діагностика біологічних систем

Галкіна Діана Володимирівна

Керівники:

Федосова Н.І.,

кандидат біологічних наук,

старший науковий співробітник лабораторії онкоімунології

та конструювання протипухлинних вакцин

ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Білько Н.М.,

доктор медичних наук, професор кафедри лабораторної діагностики НаУКМА

Кваліфікаційну роботу захищено

з оцінкою _____

Секретар ЕК

Пахаренко М. В.

«____» червня 20__ року

Київ – 2026

ЗМІСТ

Стор.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. Вплив <i>Bifidobacterium lactis</i> BB12 та <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG на імунну відповідь у здоровому організмі та при злоякісному рості	8
1.1. Біологічна характеристика пробіотичних штамів <i>Bifidobacterium lactis</i> BB12 та <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	8
1.2. Механізми взаємодії пробіотиків із клітинами імунної системи	11
1.3. Вплив пробіотиків на місцеву та системну регуляцію продукції цитокінів	12
1.4. Вплив пробіотичних штамів на перебіг і прогресію пухлинного росту	14
1.5. Особливості змін цитокінового профілю при тривалому застосуванні пробіотиків в умовах злоякісного росту	18
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ, ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	22
2.1. Об'єкт та предмет дослідження	22
2.2. Матеріали, що були використані в роботі	22
2.3. Схема експерименту	26
2.4. Методи експериментальної онкології	27
2.5. Отримання супернатантів спленоцитів	28
2.6. Підрахунок спленоцитів стандартними методами	29

2.7. Визначення рівня ключових цитокінів	31
--	----

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.	
Експериментальне дослідження впливу <i>Bifidobacterium lactis</i> BB12 та <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG на цитокіновий профіль мишей з модельним пухлинним процесом	34

3.1. Вплив <i>B. lactis</i> BB12 та <i>L. rhamnosus</i> GG на рівень продукції ряду прозапальних і протизапальних цитокінів у інтактних мишей лінії Balb/c	34
--	----

3.2. Вплив <i>B. lactis</i> BB12 та <i>L. rhamnosus</i> GG на рівень продукції ряду прозапальних і протизапальних цитокінів у мишей лінії Balb/c з аденокарциномою Ерліха	36
---	----

УЗАГАЛЬНЕННЯ	ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ
РЕЗУЛЬТАТІВ	42
Висновки	44
Список використаних джерел	46

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

IL – Interleukin (Інтерлейкін)

TNF- α – Tumor Necrosis Factor alpha (Фактор некрозу пухлин α)

IFN- γ – Interferon gamma (Інтерферон γ)

TGF- β – Transforming Growth Factor beta (Трансформуючий фактор росту β)

IL-10 – Interleukin-10 (Інтерлейкін-10)

IL-4 – Interleukin-4 (Інтерлейкін-4)

Th1/Th2 – T-helper type 1 / T-helper type 2 (Т-хелпери 1 типу/ Т-хелпери 2 типу)

NK – Natural Killer cells (Природні кілерні клітини)

DCs – Dendritic Cells (Дендритні клітини)

B. lactis BB12/ *B. animalis* BB12 – *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12

L. rhamnosus GG – *Lactobacillus rhamnosus* GG

CFU(KYO) – Colony Forming Unit (Колонієутворююча одиниця)

ELISA(ІФА) – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Імуноферментний аналіз)

PCR(ПЛР) – Polymerase Chain Reaction (Полімеразна ланцюгова реакція)

DNA(ДНК) – Deoxyribonucleic Acid (Дезоксирибонуклеїнова кислота)

RNA(РНК) – Ribonucleic Acid (Рибонуклеїнова кислота)

PBS – Phosphate Buffered Saline (Фосфатно-сольовий буфер)

RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium (Живильне середовище RPMI)

FBS – Fetal Bovine Serum (Фетальна теляча сироватка)

MHC – Major Histocompatibility Complex (Головний комплекс гістосумісності)

APC – Antigen-Presenting Cell (Антигенпрезентуюча клітина)

ROS(АФК) – Reactive Oxygen Species (Активні форми кисню)

TLR- Toll-like receptor (Toll-подібний рецептор)

ВСТУП

Злоякісні новоутворення залишаються однією з провідних причин смертності у світі та становлять серйозну медико-біологічну проблему. Сучасні підходи до лікування онкопатологій базуються на хірургічних методах, променевій терапії, хіміотерапії та імунотерапії, однак їх ефективність часто обмежується розвитком резистентності пухлинних клітин до використаних препаратів і вираженими побічними ефектами. Тому актуальним завданням сучасної онкології є пошук нових стратегій, зокрема, спрямованих на підвищення ефективності протипухлинного захисту шляхом зниження імуносупресії, яка розвивається на тлі пухлинного процесу.

Одним із перспективних на сьогодні напрямів є вивчення взаємодії між кишковою мікробіотою та імунною системою при злоякісному рості. Відомо, що склад мікробіоти безпосередньо впливає на активність імунних клітин, продукцію цитокінів та баланс між прозапальними і протизапальними сигналами. Порушення цього балансу може сприяти прогресії пухлинного процесу, тоді як його корекція сприяє відновленню протипухлинної відповіді.

Пробіотики – живі мікроорганізми, які, потрапляючи в організм у достатніх кількостях, чинять позитивний вплив на здоров'я людини. Останніми роками зростає кількість досліджень, які підтверджують їхню здатність не лише відновлювати мікробіоту, а й модулювати імунітет. Зокрема, пробіотики можуть впливати на синтез цитокінів, що відіграють ключову роль у розвитку протипухлинної імунної відповіді. Прозапальні цитокіни (IL-4, IFN- γ , TNF- α) стимулюють активність Т-лімфоцитів та НК-клітин, тоді як протизапальні (IL-10, TGF- β) сприяють імунній толерантності та пригнічують протипухлинну реакцію.

Таким чином, дослідження ролі мікробіоти у регуляції цитокінового профілю при злоякісному рості відкриває нові можливості для розробки допоміжних терапевтичних стратегій. Використання експериментальних моделей дозволяє більш детально проаналізувати вплив представників різних

штамів бактерій на імунну відповідь і оцінити їх потенціал у протипухлинній терапії.

Мета роботи – з'ясування впливу *Bifidobacterium lactis* BB12 та *Lactobacillus rhamnosus* GG на цитокіновий профіль та протипухлинну імунну відповідь мишей лінії Balb/c з перещепленою аденокарциномою Ерліха.

Об'єкт дослідження

Імунна відповідь організму при експериментальній моделі злоякісного росту.

Предмет дослідження

Зміни рівнів продукції цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10, ІФН- γ , ФНП- α) спленоцитами і макрофагами мишей з аденокарциномою Ерліха під впливом *Bifidobacterium lactis* BB12 та *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Відповідно до мети були поставлені такі завдання:

1. Дослідити вплив *B. lactis* BB12 та *L. rhamnosus* GG на рівень продукції ключових (прозапальних і протизапальних) цитокінів у інтактних мишей лінії Balb/c
2. Оцінити ефективність застосування *B. lactis* BB12 та *L. rhamnosus* GG у мишей з аденокарциномою Ерліха за стандартними показниками пухлинного росту.
3. Дослідити вплив *B. lactis* BB12 та *L. rhamnosus* GG на рівень продукції ключових (прозапальних і протизапальних) цитокінів у тварин з модельним пухлинним процесом (аденокарцинома Ерліха).
4. Оцінити можливість використання *Bifidobacterium lactis* BB12 та *Lactobacillus rhamnosus* GG в якості засобу допоміжної терапії з метою підсилення протипухлинної імунної відповіді.

Розділ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.

Вплив *Bifidobacterium lactis* BB12 та *Lactobacillus rhamnosus* GG на імунну відповідь у здоровому організмі та при злоякісному рості

1.1. Біологічна характеристика пробіотичних штамів *Bifidobacterium lactis* BB12 та *Lactobacillus rhamnosus* GG

Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 - один із найбільш вивчених штамів біфідобактерій. Його представники є грампозитивними нерухомими анаеробними бактеріями, які продукують молочну кислоту і не мають каталазної активності. BB-12 мають нерегулярну паличкоподібну форму, не утворюють спор і є одними з найбільш поширених бактерій, що входять до складу пробіотиків, а також популярним модельним об'єктом для вивчення властивостей біфідобактерій[39]. На перших етапах дослідження BB-12 вважалося, що цей штам слід віднести до виду *Bifidobacterium bifidum*, проте в подальшому за допомогою молекулярно-генетичних методів було показано, що штам відноситься до виду *Bifidobacterium animalis* та підвиду *lactis*[65]. Геном BB-12 був повністю секвенований у 2010[27].

Згідно з результатами протеомного аналізу, штам BB-12 може продукувати позаклітинні білки, що зв'язують олігосахариди, амінокислоти та іони магнію, а також ферменти, здатні метаболізувати бактеріальні клітинні стінки, і близько двох десятків білків, які забезпечують взаємодію з клітинами епітелію кишечника[30]. Біфідобактерії BB-12 добре переносять дію кислотного середовища шлунка, а також жовчних кислот і солей, які у високих концентраціях присутні в тонкому кишечнику[112]. Іншою особливістю BB-12 є здатність ефективно закріплюватися на слизовій оболонці кишечника, у тому числі після ротавірусної інфекції. Бактерії *B. animalis subsp. lactis* BB-12 були використані як об'єкт у більш ніж 130 клінічних дослідженнях, внаслідок чого

було виявлено ряд властивостей, які дозволяють вважати BB-12 гарною основою для пробіотичних препаратів[105].

Здатність протистояти механізмам, що захищають кишечник від бактеріальних патогенів, дозволяє біфідобактеріям BB-12 проходити всі відділи шлунково-кишкового тракту, залишаючись життєздатними та активними. Згідно з деякими даними, постійний прийом пробіотичних препаратів та добавок, що містять BB-12, впливає на баланс кишкової мікрофлори, скорочуючи кількість окремих потенційно патогенних бактерій[75].

Існують свідчення, що пробіотичні бактерії і, зокрема , *B. animalis subsp. lactis* BB-12 можуть стимулювати роботу імунної системи і навіть збільшувати ефективність відповіді на введення ряду вакцин[90], проте механізми цих ефектів вивчені не повністю[82].

Продовжуються дослідження щодо ефективності та безпечності прийому пробіотиків на основі BB-12 одночасно з антибіотиками[64]. Існують побоювання, що деякі біфідобактерії, які несуть гени стійкості до окремих антибіотиків (наприклад, тетрацикліну), можуть передати ці гени потенційно патогенним бактеріям організму [92]. У зв'язку з цим ведуться розробки штамів біфідобактерій без стійкості до тетрацикліну.

Lactocaseibacillus rhamnosus (раніше *Lactobacillus rhamnosus*[96]) – це бактерія, яку спочатку вважали підвидом *L. casei*, але генетичні дослідження виявили, що вона є окремим видом у кладі *L. casei*, яка також включає *L. paracasei* та *L. Zeae*[96]. Це коротка грампозитивна гомоферментативна факультативно-анаеробна паличка, що не утворює спор, яка часто з'являється ланцюжками. Деякі штами бактерій *L. rhamnosus* використовуються як пробіотики та особливо корисні для лікування інфекцій жіночого уrogenітального тракту, зокрема дуже важких для лікування випадків бактеріального вагінозу. Види *L. rhamnosus* та *Limosilactobacillus reuteri* зазвичай зустрічаються у здорових жіночих сечостатевих шляхах і допомагають

відновити контроль над надмірним розмноженням дисбіотичних бактерій під час активної інфекції[15] . *L. rhamnosus* іноді використовується в молочних продуктах, таких як ферментоване молоко, або як незаквасочна молочнокисла бактерія (NSLAB) у довгозрілому сирі[54]. Хоча *L. rhamnosus* вважається корисним мікроорганізмом, він може бути шкідливим для певних груп населення; у рідкісних випадках, особливо при ослабленні імунної системи або у немовлят, він може спричинити ендокардит[6]. Незважаючи на небагаточисельні інфекції, спричинені *L. rhamnosus*, цей вид включено до списку видів бактерій з кваліфікованим статусом передбачуваної безпеки (QPS) Європейського агентства з безпеки харчових продуктів[1].

L. rhamnosus GG (ATCC 53103) – це штам *L. rhamnosus*, який був виділений у 1983 році з кишкового тракту здорової людини; заявку на патент подано 17 квітня 1985 року Шервудом Горбахом та Баррі Голдіном[14]. Аббревіатура «GG» походить від перших літер їхніх прізвищ[98]. Патент стосується штаму «*L. acidophilus* GG» з номером доступу Американської колекції типових культур (ATCC) 53103; пізніше перекласифікованого як штам *L. rhamnosus*. У патенті стверджується, що штам *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) є кислотостійким та жовчностійким, має високу авідність до клітин слизової оболонки кишечника людини та виробляє молочну кислоту. З моменту відкриття штаму *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) його різноманітні переваги для здоров'я були ретельно вивчені, і наразі штам *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) є однією з найбільш вивчених пробіотичних бактерій у світі, про що було свідчать результати понад 800 наукових досліджень. Послідовність геному *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) була розшифрована у 2009 році[14].

Хоча *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) здатний виживати в кислотному середовищі та жовчі шлунка та кишечника[14], стверджується, що він колонізує травний тракт та забезпечує баланс кишкової мікробіоти. Дані досліджень свідчать, що *L. rhamnosus*, подібно до практично всіх пробіотичних лактобактерій, є лише тимчасовим мешканцем і не є автохтонним[115]. Ці

особливості роблять його сприятливим об'єктом для досліджень щодо ефективності пробіотичних добавок в якості потенційних лікарських засобів для корекції різних патологічних станів[5].

Продемонстровано, що *L. rhamnosus* GG корисний для профілактики та лікування ротавірусної діареї у дітей. Профілактика *L. rhamnosus* GG може бути корисним також для профілактики та лікування різних видів діареї у дітей та дорослих, зокрема діареї, пов'язаної з прийомом антибіотиків[76].

1.2. Механізми взаємодії пробіотиків із клітинами імунної системи

Представники пробіотичних штамів *B. lactis* BB12 та *L. rhamnosus* GG взаємодіють з клітинами імунної системи через низку механізмів, що охоплюють місцеві (кишкові) та системні шляхи.

B. lactis BB12 здатний колонізувати слизову оболонку кишечника, адгезуватися до клітин епітелію, що сприяє зміцненню бар'єрної функції та зниженню проникності для патогенів. Також він стимулює секрецію муцину та підтримує цілісність слизової оболонки[63].

L. rhamnosus GG має спеціальні волокнисті структури – пілі (SpaCBA), які забезпечують прикріплення до слизової оболонки та взаємодію з рецепторами епітеліальних клітин, що впливає на їх імуномодулюючу активність[96].

Мікроорганізми розпізнаються клітинами вродженого імунітету (макрофаги, дендритні клітини) через рецептори розпізнавання патернів, зокрема Toll-подібні рецептори (TLR). Це спричиняє продукцію прозапальних цитокінів (IL-1 β , TNF- α , IL-12) та активацію фагоцитозу. *B. lactis* BB12 у дослідженнях продемонстрував здатність активувати TLR і стимулювати секрецію IL-10[38]. *L. rhamnosus* GG завдяки своїм поверхневим білковим структурам також може модулювати відповідь макрофагів, індукуючи

продукцію IL-10 (антизапальний ефект) та знижуючи рівень деяких прозапальних цитокінів, наприклад IL-6[96].

Активація дендритних клітин пробіотиками стимулює презентацію антигену та диференціацію Т-лімфоцитів. Показано, що *L. rhamnosus* GG може активувати відповідь Th1-лімфоцитів із підвищеною продукцією IFN- γ та IL-12, а також впливати на функції регуляторних Т-клітин через збільшення секреції IL-10[42].

Штам *B. lactis* BB12 сприяє підвищенню рівня секреторного IgA В-лімфоцитами у слизових оболонках, що посилює місцевий захист від патогенів [63]. Місцеві зміни у кишечнику (адгезія, зміна мікробіоти, активація епітелію) стимулюють імунну систему загалом, що проявляється підвищенням активності циркулюючих імунних клітин та змінами у цитокіновому профілі периферичної крові. У дослідженнях із *B. lactis* BB12 було зафіксовано зниження системного запалення та рівнів прозапальних маркерів[60]. *L. rhamnosus* GG також може впливати на імунітет поза межами шлунково-кишкового тракту опосередковано за рахунок секреції метаболітів та біоактивних сполук[42].

1.3. Вплив пробіотиків на місцеву та системну регуляцію продукції цитокінів

Пробіотичні штами *B. lactis* BB12 та *L. rhamnosus* GG (LGG) демонструють здатність модулювати продукцію цитокінів як локально (на рівні тканин: кишкових епітеліальних, слизових), так і на системному рівні через кровоток.

У дослідженнях на епітеліальних клітинах кишечника *L. rhamnosus* GG зменшував експресію прозапальних цитокінів, таких як IL-1 β , у відповідь на

стимуляцію ліпополісахаридом (LPS) або іншими запальними подразниками, та одночасно збільшував рівні протизапальних цитокінів, таких як IL-10[50].

B. lactis BB12 показав здатність дозозалежно стимулювати місцеву секрецію IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 та IFN- γ , що підтверджує його роль у безпосередній регуляції властивостей клітин епітелію та імунних клітин слизової оболонки кишечника[107].

При використанні BB-12 у харчових продуктах (наприклад, йогурті) спостерігали пригнічення запальних реакцій на рівні епітелію кишечника, зменшення рівня прозапального цитокіну TNF- α , зміни у роботі рецепторів, таких як TLR-2, на клітинах слизової оболонки.

Клінічні дослідження за участю практично здорових осіб показали, що вживання BB-12 призводило до зменшення вмісту TNF- α в периферичній крові, а також до зниження експресії рецептору TLR-2 на CD14⁺HLA-DR⁺ клітинах після споживання пробіотику у формі йогурту чи капсул.

Експериментальні дослідження на тваринних моделях продемонстрували, що *L. rhamnosus* GG зменшував рівні прозапальних цитокінів в тканинах печінки та плазмі крові при індукції запалення, а також підвищував рівні протизапальних цитокінів, таких як IL-10 у легенях чи інших органах[50].

У комбінованих інтервенційних дослідженнях за участю людей старшої вікової категорії було показано, що поєднане застосування *L. rhamnosus* GG та BB-12 протягом декількох місяців призводило до зменшення маркерів системного запалення (наприклад, TNF- α) та покращення імунних параметрів у периферичній крові[13].

1.4. Вплив пробіотичних штамів на перебіг і прогресію пухлинного росту

Пробіотики привертають увагу дослідників завдяки своїм потенційним протипухлинним властивостям, які можуть бути реалізовані різними шляхами. Нижче наведено деякі ключові способи, за допомогою яких пробіотики можуть допомогти в профілактиці та лікуванні раку[17,93,8,94].

Одним з основних механізмів, за допомогою якого пробіотики можуть захищати від розвитку раку, є модуляція шлунково-кишкового мікробіому. Ріст патогенних бактерій (*Clostridium difficile*, *Escherichia coli* (*E. coli*) та *Fusobacterium nucleatum*), які пов'язують з підвищеним ризиком розвитку певних видів раку, може бути вибірково пригнічений пробіотиками[33,53,21]. Бактеріоцини, органічні кислоти та перекис водню є деякими з антимікробних речовин, що виробляються пробіотиками для досягнення цієї мети. Ці речовини здатні ефективно обмежувати ріст небезпечних мікробів[115,16]. Більше того, пробіотики відіграють значну роль у запобіганні росту патогенних мікробів шляхом підтримки балансу та диференціювання кишкового мікробіому, обумовлюючи зниження ймовірності розвитку раку.

Пробіотики відіграють значну роль у зменшенні кількості канцерогенних речовин в організмі шляхом регулювання ферментів, що беруть участь у метаболічному перетворенні[86,32]. Метаболізм харчових інгредієнтів, наприклад, нітрозамінів та жовчних кислот, може нейтралізувати канцерогенні сполуки[45]. Пробіотики, до яких належать види *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*, мають потенціал запобігати вторинному виробленню жовчної кислоти, яке пов'язується з розвитком колоректального раку[75,70]. Природний баланс осі кишечник-печінка може бути відновлений за допомогою застосування пробіотиків[117,118]. Це досягається шляхом регулювання метаболізму жовчної кислоти, зниження рівня оксидативного стресу та модифікації експресії генів при раку печінки.

Одним з основних способів, яким пробіотики можуть допомогти запобігти розвитку раку, є блокування метаболізму канцерогенів[53,28]. Деякі кишкові бактерії мають ферменти, які можуть розщеплювати забруднювачі навколишнього середовища та харчові інгредієнти на сполуки, що викликають рак, такі як нітрозаміни, поліциклічні ароматичні вуглеводні та гетероциклічні аміни[44,95]. Активність цих бактеріальних ферментів може бути пригнічена пробіотиками, такими як види *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*, які зменшують перетворення цих сполук у їх канцерогенні форми[100,74]. Наприклад, було показано, що *L. acidophilus* перешкоджає функції бактеріальних нітроредуктаз, які відповідають за перетворення нітрозамінів у більш потужні канцерогени[25,52,85]. Пробиотики мають здатність впливати на активність ферментів хазяїна, що беруть участь у метаболізмі канцерогенів. Пробиотичні штами *L. rhamnosus* та *Bifidobacterium*, як було показано, підвищують експресію ферментів детоксикації фази II, які відповідають за кон'югацію та виведення канцерогенів[74]. Ці ферменти включають глутатіон-S-трансферази та UDP-глюкуронозилтрансферази. Завдяки підвищенню здатності хазяїна метаболізувати та видаляти канцерогени, пробіотики мають потенціал для зниження ризику того, що канцерогени можуть спричинити або прискорити ріст раку[98]. Гетероциклічні аміни та вторинні жовчні кислоти – це два приклади продуктів, які можуть бути трансформовані в канцерогенні метаболіти. Ці метаболіти виробляються певними бактеріями, що живуть у кишечнику. Пробиотики мають здатність змінювати склад кишкового мікробіому, а також його метаболізм, що, у свою чергу, зменшує вироблення сполук, які є отруйними для організму[42,60]. Було продемонстровано, що види *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* перешкоджають процесу 7α -дегідроксилування первинних жовчних кислот. Це один з найважливіших етапів у виробництві вторинних жовчних кислот, які пов'язані з підвищеною ймовірністю розвитку колоректального раку[89,30]. Крім того, було продемонстровано, що коротколанцюгові жирні кислоти (КЖК), такі як бутират, ацетат та пропіонат, здійснюють активність, яка пригнічує розвиток раку. Виробництво цих КЖК

можна збільшити за допомогою пробіотиків[100,103]. Ці коротколанцюгові жирні кислоти мають потенціал змінювати епігенетичні шляхи, що регулюють експресію генів-супресорів пухлин та онкогенів. Крім того, вони мають здатність пригнічувати проліферацію ракових клітин та сприяти загибелі клітин шляхом апоптозу[68,11]. Загалом, одним із найважливіших способів, яким пробіотики можуть допомогти у профілактиці раку, є запобігання метаболізму потенційно канцерогенних речовин[46,45].

Пробіотики можуть посилювати вироблення білків щільних контактів, таких як окклюдин, а також клаудини, покращуючи кишковий епітеліальний бар'єр. Цей бар'єр має вирішальне значення для контролю над проникненням шкідливих речовин, включаючи канцерогени, з просвіту кишечника в організм[91,80]. Вони є потенційною речовиною для підтримки функції кишкової бар'єрної системи. Завдяки покращенню цілісності кишкового бар'єру, пробіотики можуть зменшити взаємодію господаря з канцерогенними речовинами та запобігти системному надходженню цих речовин. Пробіотики мають здатність змінювати мікробіом кишечника, що може допомагати запобігати та лікувати кілька видів раку[61]. Склад базової кишкової мікробіоти є значним фактором, що впливає на ефективність пробіотиків. Індивідуальні реакції на лікування пробіотиками можуть значною мірою залежати від змін у метаболічних функціях, різноманітності мікробіома та мікробних таксонах[97,119,37]. Пробіотики можуть бути більш корисними для пацієнтів з диверсифікованим мікробіомом, оскільки його можна посилити шляхом доповнення вже існуючих мікробних популяцій[123]. В одному дослідженні базовий стан мікробіому у жінок у постменопаузі з ожирінням не передбачав терапевтичної відповіді на багатовидові пробіотики. Проте, застосування пробіотиків змінило функціональний вплив мікробіоти на метаболічні маркери[40]. Глобальне різноманіття та склад мікробіому у здорових дітей залишалися відносно стабільними, незважаючи на збільшення кількості представників різних штамів при застосуванні пробіотиків. Це свідчить про те,

що базовий стан здоров'я та стабільність мікробіому можуть обмежувати очікувану ефективність пробіотиків[110,44]. Склад мікробіому може бути додатково модульований віком, дієтою та станом здоров'я, що може впливати на ефективність пробіотиків. Певні групи пацієнтів можуть отримати користь від пробіотичної терапії, яка адаптована залежно від цих базових характеристик[35].

Ангіогенез (утворення нових кровоносних судин) є важливим для росту та поширення солідних пухлин. Було показано, що пробіотики пригнічують вироблення проангіогенних факторів, необхідних для утворення нових кровоносних судин[55,12]. Матриксні металопротеїнази (ММП) та фактор росту судинного ендотелію (VEGF) є двома прикладами цих факторів. Пробіотики мають потенціал запобігати отриманню злоякісним новоутворенням кисню та поживних речовин, необхідних для росту та поширення, шляхом пригнічення процесу ангіогенезу[12,55]. Серед молекул, що беруть участь у процесі метастатичного поширення, пробіотики мають здатність пригнічувати експресію специфічних молекул. Ці молекули включають молекули адгезії, які відповідають за опосередкування прикріплення пухлинних клітин до судинного ендотелію, та ММП, які сприяють руйнуванню позаклітинного матриксу. Завдяки своїй здатності пригнічувати механізми, що сприяють розвитку метастазування, пробіотики мають потенціал знижувати здатність пухлинних клітин до інфільтрації, міграції та утворення вторинних пухлин в інших місцях[19,55,69]. Однією з найважливіших стадій метастазування є епітеліально-мезенхімальний перехід, який відбувається на ранніх стадіях захворювання. Під час цієї фази епітеліальні клітини втрачають свою полярність та здатність прилипати до інших клітин, і вони розвивають фенотип, який є більш інвазивним та схильним до міграції[69]. Пробіотики можуть перешкоджати прогресуванню ЕМП, запобігаючи експресії транскрипційних факторів[17,58]. Завдяки своїй здатності пригнічувати ЕМП, пробіотики мають потенціал перешкоджати

здатності пухлинних клітин поширюватися з первинного місця, інфільтрувати через позаклітинний матрикс та утворювати вторинні пухлини в різних ділянках[55,58].

Отже, експериментальні і клінічні дані свідчать, що BB-12 і LGG мають кілька потенційних механізмів, які можуть уповільнювати прогресію пухлинного росту і/або покращувати відповіді пацієнтів на терапію (зокрема, імуномодуляція, продукція антипроліферативних метаболітів, зниження запалення). Однак для включення представників цих штамів у стандарти терапії пацієнтів онкологічного профілю необхідні подальші ретельно сплановані клінічні дослідження, що оцінюють ефективність і безпечність їх застосування при конкретних типах пухлин та різних режимах лікування.

1.5. Особливості змін цитокінового профілю при тривалому застосуванні пробіотиків в умовах злоякісного росту

Тривале застосування пробіотичних штамів *B. lactis* BB-12 та *L. rhamnosus* GG суттєво впливає на регуляцію цитокінового профілю організму, що є важливим чинником у формуванні протипухлинної імунної відповіді. Дані експериментальних і клінічних досліджень свідчать про двонаправленість цих ефектів: з одного боку, відмічена стимуляція протипухлинних імунних механізмів, а з іншого – зниження рівня хронічного запалення, яке може сприяти прогресії пухлинного процесу[70,48,73].

Встановлено, що тривалий прийом пробіотиків LGG призводить до підвищення рівнів інтерферону- γ (IFN- γ) та інтерлейкіну-12 (IL-12), що сприяє активації цитотоксичних Т-лімфоцитів і природних кілерів (NK-клітин). Це підсилює протипухлинний імунітет та підвищує ефективність імунотерапії, зокрема терапії інгібіторами контрольних точок[93,8].

Водночас спостерігається зниження рівня прозапальних цитокінів — фактора некрозу пухлини- α (TNF- α), інтерлейкіну-6 (IL-6) та інтерлейкіну-17

(IL-17), що зменшує канцерогенне мікросередовище, характерне для запально-опосередкованого раку товстої кишки та інших пухлин[48,33].

Особливу увагу привертає підвищення продукції протизапальних цитокінів, зокрема інтерлейкіну-10 (IL-10) та трансформуючого фактора росту β (TGF- β), яке спостерігалось при тривалому застосуванні BB-12. Це сприяє зниженню імунопатологічних реакцій та покращує переносимість протипухлинної терапії. Проте надмірне підвищення регуляторних цитокінів може обмежувати протипухлинну активність цитотоксичних клітин, що потребує врахування у клінічних умовах[63,78].

Важливо зазначити, що цитокінові ефекти пробіотиків мають виражену штам- та контекст-специфічність: однаковий штам може викликати різні зміни у здорових осіб, у тваринних моделях злоякісного росту або в імуносупресованих пацієнтів. Комбінації LGG та BB-12 часто виявляють синергічний ефект: посилення IFN- γ -опосередкованої відповіді при одночасному зниженні IL-6 і TNF- α [13,81].

Імунологічний ландшафт пухлини може залежати від метаболітів, наприклад, SCFA, які можуть запобігати утворенню пропухлинних імунних клітин та збільшувати проліферацію регуляторних Т-клітин (Treg) А. Крім того, пробіотики можуть змінювати склад позаклітинного матриксу шляхом взаємодії зі стромальними клітинами, включаючи фібробласти та ендотеліальні клітини, створюючи середовище, більш сприятливе для протипухлинного імунітету[53]. Більше того, метаболічний стан стромальних клітин може залежати від пробіотичних метаболітів, що може призвести до модифікацій, що підтримують руйнування пухлини[53]. Крім того, було встановлено, що такі метаболіти, як SCFA та мікробні катаболіти триптофану, відіграють важливу роль у регулюванні метаболіту метаболізму триптофану, посиленні протипухлинних імунних відповідей та впливі на дію імунних клітин[56]. Через різноманітні сигнальні шляхи численні пробіотики можуть потенційно

безпосередньо взаємодіяти з пухлинними клітинами, запускаючи апоптоз або запобігаючи проліферації[56,53]. При вживанні пробіотиків спостерігається збільшення експресії молекул, що належать до головного комплексу гістосумісності (МНС) класу I та класу II. Це може призвести до покращення здатності імунної системи розпізнавати та знищувати ракові клітини[90]. Крім того, клітини кишкового епітелію, які діють як бар'єр проти патогенів та сприяють підтримці імунологічного гомеостазу, мають потенціал для ефективнішого функціонування, коли пробіотики інтегровані в їхній раціон[80]. Вироблення медіаторів запалення, таких як простагландини, лейкотрієни та цитокіни, зазвичай високе у онкологічних хворих[108]. Пробіотики мають потенціал регулювати вироблення цих медіаторів, рівень яких часто підвищений у онкологічних хворих. Вони можуть запобігати важливим запальним шляхам, які беруть участь у виникненні та прогресуванні раку, включаючи каскади сигналізації NF- κ B та MAPK[108,18]. Вони мають здатність блокувати активацію основних запальних шляхів. Існують докази, що пробіотики мають здатність пригнічувати активацію запальних сигнальних шляхів, які є критично важливими для росту пухлин, ангіогенезу та метастазування. Одним із таких шляхів є, зокрема COX-2/PGE2[108,104]. Пробіотики здатні модулювати кишковий мікробіом та впливати на синтез бактеріальних метаболітів, таких як SCFA, що мають протизапальні та протипухлинні властивості. За даними клінічних досліджень пробіотики можуть допомогти зупинити розвиток та поширення кількох видів раку (таких як колоректальний рак, рак легень, печінки, молочної залози та простати) шляхом зниження хронічного запалення[24,86].

Підсумовуючи наведені вище дані можна зробити висновок, що тривале застосування пробіотиків може супроводжуватись підсиленням як прозапальних, так і протизапальних реакцій. Такі властивості мікробіоти необхідно враховувати при призначенні пробіотиків пацієнтам з різними патологічними станами. Зокрема, обумовлене використанням пробіотиків

зниження рівня прозапальних цитокінів (зокрема, IL-10, TGF- β) є корисним при лікуванні запальних процесів в кишечнику, проте може виявитись критичним в умовах злоякісного росту і сприяти розвитку імуносупресії. Крім того, вже продемонстровано, що представники різних штамів одного виду мікроорганізмів можуть мати протилежний вплив на напрямок індукованої ними імунної відповіді. Це може сприяти як уповільненню пухлинного росту та зменшенню токсичності протипухлинної терапії, так і підсиленню прогресії пухлини. Баланс між протипухлинною активністю та здатністю до імунорегуляції залишається ключовим фактором, що визначає кінцевий результат впливу пробіотиків[9,48,77].

Тому метою даної роботи стало дослідження впливу *B. lactis* Bb12 та *L. rhamnosus* GG на цитокіновий профіль та протипухлинну імунну відповідь мишей лінії Balb/c з модельним пухлинним процесом.

Розділ 2.

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт та предмет дослідження

Об'єктом експериментальної роботи була імунна відповідь організму при експериментальній моделі злоякісного росту.

В свою чергу, предметом дослідження були зміни рівнів продукції цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10, ІФН- γ , ФНП- α) спленоцитами і макрофагами мишей з аденокарциномою Ерліха під впливом *Bifidobacterium lactis* BB12 та *Lactobacillus rhamnosus* GG.

В дослідженні використані миші лінії Balb/c (самки, віком 2,0–2,5 міс., масою 19,0–22,0 г), які були одержані з розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Тварини перебували у стандартних умовах віварію з природним режимом освітлення на повноцінному раціоні харчування. Утримання мишей та робота з ними здійснювались відповідно до стандартних міжнародних правил з біологічної етики та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях[20].

Для відтворення пухлинного процесу використовували дві форми введення пухлинної суспензії: підшкірну та внутрішньоочеревинну. Після підшкірного введення пухлини у мишей візуально можна було спостерігати новоутворення в ділянці стегна (пухлинний вузол), що збільшувався з кожною добою. При перитонеальному введенні клітин пухлини у мишей розвивався асцит, що візуально спричиняв ефект роздування черевної порожнини.

В якості моделі пухлинного росту використана солідна аденокарцинома Ерліха (АКЕ), яка спонтанно виникла у мишей-самиць як аденокарцинома

молочної залози. АКЕ є загальноприйнятою експериментальною моделлю раку молочної залози людини [83]. Пухлинні клітини одержували з Банку клітинних ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Для перещеплення пухлин суспензію клітин АКЕ вводили внутрішньом'язево в стегно правої задньої лапи по 5×10^5 клітин/мишу.

В якості пробіотичних препаратів використані ліофілізовані клітини *B. animalis subsp. lactis* BB-12 (Lek Pharmaceuticals, Любляна, Словенія) та *L. rhamnosus* GG (Probiotical S.p.A., Швейцарія). Пробіотики вводили per os, по 7×10^5 КУО/мишу на введення, щоденно, протягом 28 діб.

2.2. Матеріали , що були використані в роботі

2.2.1 Розчини, реактиви та культуральні середовища

У роботі було використано наступні розчини та культуральні середовища:
 RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США);
 100% фетальна теляча сироватка (Fetal Bovine Serum, BioWest, Франція);
 фосфатно-сольовий буфер (PBS, Sigma-Aldrich, Німеччина);
 фізіологічний розчин 0,9% NaCl (Юрія-Фарм, Україна);
 барвник трепановий синій (Sigma-Aldrich, Німеччина);
 Ficoll-400 (Sigma-Aldrich, США);
 Верографін 76% (Spofa, Чехія);
 гіпотонічний лізуючий буфер АСК (Thermo Fisher Scientific, США);
 дистильована вода лабораторного очищення (Хімлаборреактив, Україна).

У роботі були використані такі реактиви:

комерційні тест системи BD OptEIA Set Mouse TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-4 (BD Biosciences, США);
 антимишачі антитіла (BD Biosciences, США) ;
 стрептавідин, кон'югований із ферментом пероксидазою хрому (Thermo Fisher Scientific, США);

ліофілізовані клітини *B. animalis subsp. lactis* BB-12 (Lek Pharmaceuticals, Любляна, Словенія) та *L. rhamnosus* GG (Probiotical S.p.A., Швейцарія);

70% розчин етилового спирту (Юрія-Фарм, Україна).

2.2.2. Приготування розчинів та культуральних середовищ

Для культивування клітин використовували поживне середовище RPMI-1640, доповнене 100% Fetal Bovine Serum.

Середовище готували в асептичних умовах у ламінарній шафі. До стерильного базового середовища додавали фетальну телячу сироватку у співвідношенні 1:10 для отримання кінцевої концентрації 10%. Зокрема, до 90 мл базового середовища додавали 10 мл фетальної телячої сироватки.

Перед використанням фетальну телячу сироватку попередньо розморожували при температурі +4 °C та ретельно перемішували. Готове культуральне середовище зберігали при температурі +4 °C не довше одного місяця.

Приготування градієнту щільності фікол-верографіну: для виділення моноклеарних клітин селезінки було самостійно виготовлено градієнт щільності 1,077 г/мл на основі суміші полісахариду Ficoll-400 та рентгеноконтрастної речовини Верографін 76%. На першому етапі готували водний розчин Ficoll-400: наважку масою 4,32 г повністю розчиняли у 48 мл дистильованої води за постійного перемішування на магнітній мішалці при кімнатній температурі. Паралельно готували робочий розчин Верографіну шляхом розведення 10,14 мл 76% комерційного концентрату дистильованою водою до кінцевого об'єму 21 мл.

На другому етапі отримані розчини Ficoll-400 та Верографіну об'єднували в загальному флаконі та ретельно гомогенізували. Кінцевий контроль щільності суміші здійснювали за допомогою каліброваного ареометра за температури +20°C, досягаючи цільового значення $1,077 \pm 0,001$ г/мл. Отриманий градієнт стерилізували шляхом фільтрації через мембранний шприцевий фільтр із розміром пор 0,22 мкм в асептичних умовах ламінарної

шафи та зберігали в захищеному від світла посуді при температурі +4°C не більше 30 діб.

2.2.3. Лабораторний посуд та витратні матеріали

В роботі було використано таке обладнання і витратні матеріали:
планшет імунологічний для ІФА, 96 лунок плоскодонну, стер. (Nuova Aptaca) 7% (Хімлаборреактив, Україна);
стерильні пробірки та мікропробірки типу Eppendorf 1,5 мл(Хімлаборреактив, Україна);
підставки для мікропробірок;
стерильні чашки Петрі без поживного середовища SPL d=60 мм h=15 мм (Хімлаборреактив, Україна);
шприци одноразові з голками об'ємом 2 мл та 5 мл (Юрія-Фарм, Україна);
мембранний шприцевий фільтр із розміром пор 0,22 мкм (Millipore, США);
скальпелі та ножиці (Aescular, Німеччина);
капіляри (Hirschmann, Німеччина);
піпетка Пастера капілярна ПЕ Kartell (Хімлаборреактив, Україна);
стерильна вата(Юрія-Фарм, Україна);
фільтр мембранний MSE Ø47-50 мм, 22 мкм(ТермоЛаб, Україна);
накінецьник тип Гілсон 0,5-200 мкл, жовтий(Sente-Lab, Україна);
накінецьник тип Гілсон 100-1000 мкл, синій (Sente-Lab, Україна);
камера Горяєва MICROmed 2-х секційна (МІКРОмед, Україна);
лабораторні ступки (Склоприлад, Україна).

2.2.4. Лабораторне обладнання

В роботі було використано таке обладнання:
гомогенізатор клітин Поттера 15 мл Kartell (Хімлаборреактив, Україна);
ареометр (Загального призначення) АЗП-3 1000-1400 (Хімлаборреактив, Україна);
дозатор піпеточний восьмиканальний MICROmed Лайт змінного об'єму 5-50 мкл(МІКРОмед, Україна);

дозатор піпеточний MICROmed Лайт змінного об'єму 100-1000 мкл(МІКРОмед, Україна);

лабораторна центрифуга СМ-3 (МІКРОмед, Україна);

ротатор для пробірок (Хімлаборреактив, Україна);

термостат-інкубатор ТС-80 (Binder, Німеччина);

лабораторний холодильник та морозильна камера (Liebherr, Німеччина);

автоматичний мікропланшетний рідер StatFax 2100 (Awareness Technology Inc., США);

витяжна ламінарна шафа біологічної безпеки HR40-ІІВ2 (Qingdao Haier Biomedical Co.,Ltd., Китай).

2.3. Схема експерименту

З метою оцінки впливу *B. animalis subsp. lactis* BB-12 та *L. rhamnosus* GG на продукцію ряду про- та протизапальних цитокінів було проведено 2 етапи досліджень. Дози пробіотичних препаратів та схеми їх введення на обох етапах були однаковими. Імунологічні дослідження проводили через 24 год. після останнього введення пробіотичних препаратів. Визначали рівні цитокінів ІЛ-4, ІЛ-10, ІФН- γ , ФНП- α в супернатантах спленоцитів. У мишей з модельним пухлинним процесом протягом всього експерименту оцінювали стандартні показники пухлинного росту: частота перещеплення пухлин (%), латентний період виходу пухлини (добы), розмір первинного пухлинного вузла (мм³).

На першому етапі вивчали вплив пробіотиків на продукцію цитокінів спленоцитами інтактних мишей лінії Balb/c. Експериментальні тварини (n = 15) були розподілені на 3 групи: “*B. animalis*” – миші, яким протягом 28 діб вводили *B. animalis subsp. lactis* BB-12 (n = 5); “*L. rhamnosus*” – миші, яким протягом 28 діб вводили *L. rhamnosus* GG (n = 5); “Інтактний контроль, ІК” – миші, яким аналогічним чином вводили фізіологічний розчин 0,9% NaCl (n = 5).

На другому етапі дослідження проводили на мишах тієї ж лінії, статі та віку з перещепленою АКЕ. Введення пробіотичних препаратів починали з 2-ї

добі після трансплантації пухлинних клітин, курс лікування складав 28 діб. Сформовано 4 групи експериментальних тварин ($n = 20$): “АКЕ + *B. animalis*” – миші з пухлинами, яким вводили біфідобактерії ($n = 5$); “АКЕ+*L. rhamnosus*” – миші з АКЕ, яким аналогічно вводили лактобактерії ($n = 5$); “АКЕ” – миші з АКЕ, яким вводили 0,9% NaCl ($n = 5$); “Інтактний контроль, ІК” – миші без перещеплених пухлин, яким вводили 0,9% NaCl ($n = 5$).

2.4. Методи експериментальної онкології

Біологічні (*in vivo*) методи передбачають використання лабораторних тварин (найчастіше мишей і щурів). Використовуються трансплантаційні моделі пухлин. В якості моделі пухлинного росту використана солідна аденокарцинома Ерліха (АКЕ), яка спонтанно виникла у мишей-самиць як аденокарцинома молочної залози. АКЕ є загальноприйнятою експериментальною моделлю раку молочної залози людини [83]. Для перещеплення пухлин суспензію клітин АКЕ вводили внутрішньом'язево в стегно правої задньої лапи по 5×10^5 клітин/мишу. Це дозволило оцінити швидкість росту пухлини, виживаність тварин та ефективність лікування.

Оцінка імунної відповіді організму проводиться через: визначення рівня цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10, ІФН- γ , ФНП- α), імуноферментний аналіз (ELISA).

Також використовувалися фізичні методи для діагностики та оцінки пухлин.

Перебіг пухлинного процесу оцінювали за стандартними параметрами: латентний період (діб), частота виникнення пухлин (%), розміри пухлинного вузла (об'єм в мм^3).

Об'єм пухлин (V , мм^3) розраховували за формулою:

$$V = \frac{4}{3} * \pi * a * b * c,$$

де π – стала, що дорівнює 3,14,

a , b , c – пів осі еліпсу, мм.

Протипухлинний ефект оцінювали за розрахованими індексами гальмування росту пухлини (ІГРП).

Індекс гальмування росту пухлини (ІГРП) — це один із ключових показників в експериментальній онкології, який відображає ефективність

досліджуваного препарату або впливу (наприклад, пробіотиків) на пригнічення пухлинного росту.

$$\text{ІГРП} = \frac{V_{\text{контр}} - V_{\text{досл}}}{V_{\text{контр}}} \times 100\%,$$

де $V_{\text{контр}}$ – середній об’єм пухлини в контрольній групі,

$V_{\text{досл}}$ – середній об’єм пухлини в дослідній групі.

Інтерпретація результатів:

- 0% → відсутність ефекту
- до 20% → слабкий ефект
- 20–50% → помірний протипухлинний ефект
- >50% → виражений протипухлинний ефект
- ≈100% → майже повне пригнічення росту пухлини

2.5. Отримання супернатантів спленоцитів

Селезінка належить до вторинних органів імунної системи та відіграє ключову роль в імунній відповіді та гемопоезі. Червона та біла пульпа селезінки містять лімфоцити, макрофаги, дендритні клітини. Тому, рівні цитокінів, продукованих як лімфоцитами (ІЛ-4, ІФН-гамма), так і макрофагами (ІЛ-10, TNF- α) визначали в супернатантах спленоцитів.

Для цього вилучали селезінку, гомогенізували її в гомогенізаторі Поттера в живильному середовищі RPMI з 100% телячою фетальною сироваткою(в результаті розведення -10% телячою фетальною сироваткою). Мононуклеарні клітини з отриманої суспензії клітин селезінки виділяли шляхом центрифугування в градієнті щільності фікол-верографіну ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) при 1,5 тис. об/хв протягом 40 хв. Після відмивання виділені мононуклеари ресуспендували в середовищі RPMI 1640 з 10% фетальною телячою сироваткою. Підрахунок кількості життєздатних клітин проводили за стандартною методикою, використовуючи суправітальне фарбування трипановим синім[125]. Концентрацію клітин доводили до 1×10^7 в 1 мл, суспензію переносили в центрифужні пробірки та інкубували в термостаті

протягом 18 год при 37°C, 5% CO₂, 100% вологості. По завершенню терміну інкубації пробірки центрифугували (1,5 тис. об/хв протягом 10 хв), надосад відбирали у стерильні пробірки типу епендорф, заморожували та зберігали при –20 °C.

Розморожування та підготовка супернатантів спленоцитів. Кріоконсервовані за температури –20 °C зразки супернатантів спленоцитів піддавали швидкому розморожуванню на водяній бані при +37°C до повного зникнення фази льоду, після чого негайно переносили на крижану баню +4°C. Для видалення білкових конгломератів та дебрису, що утворилися внаслідок кріодеструкції, розморожені зразки центрифугували при 6000 тис.об/хв протягом 3-5 хв. Обережно відібрали надосадову рідину (верхні 80% об'єму), не зачіпаючи дно пробірки і використовували його для внесення у лунки планшета.

2.6. Підрахунок спленоцитів стандартними методами

Підрахунок спленоцитів здійснювали стандартними цитологічними методами після виділення клітин із селезінки експериментальних тварин. Для цього селезінку вилучали в асептичних умовах і гомогенізували у стерильному живильному середовищі (зазвичай RPMI-1640) з отриманням однорідної клітинної суспензії(див.п.2.5). Отриманий гомогенат фільтрували через нейлоновий фільтр для видалення тканинних уламків, після чого за необхідності проводили лізис еритроцитів з метою очищення популяції моноклеарних клітин.

Для елімінації еритроцитів до клітинного осаду додавали 3 мл стерильного гіпотонічного лізуючого буферу АСК (155 мМ NH₄Cl, 10 мМ KHCO₃, 0,1 мМ EDTA, pH 7,3) і інкубували суміш протягом 3 хв при кімнатній температурі. Реакцію лізису зупиняли додаванням 10-кратного об'єму холодного середовища RPMI-1640, збагаченого 5% фетальної телячої сироватки. Отриману суспензію моноклеарних клітин селезінки двічі

промивали робочим середовищем шляхом центрифугування (1500 тис.об/хв, 5 хв) та ресуспендували у повному живильному середовищі для подальшого культивування.

Для визначення кількості клітин та їх життєздатності використовували метод фарбування трипановим синім.

Перед підрахунком здійснювали розведення вихідної суспензії клітин барвником у співвідношенні 1:1 (фактор розведення = 2). У стерильну мікропробірку типу Eppendorf об'ємом 0,5 мл вносили 20 мкл ретельно гомогенізованої суспензії спленоцитів. До клітин додавали 20 мкл 0,4% робочого розчину трипанового синього. Вміст пробірки обережно перемішували шляхом піпетування (3–4 рази) та інкубували при кімнатній температурі рівно 3 хвилини. Експозицію суворо контролювали, оскільки тривале перебування клітин у барвнику (> 5 хв) призводить до токсичного пошкодження живих спленоцитів та штучного заниження показника життєздатності.

Камеру Горяєва та спеціальне шліфоване покривне скло попередньо протирали 70% розчином етилового спирту та висушували. Покривне скло притирали до камери легким натисканням до появи райдужних кілець (кілець Ньютона), що свідчить про фіксацію стабільної глибини камери (0,1 мм). За допомогою мікропіпетки відбирали 10 мкл забарвленої суміші клітин та за рахунок капілярного ефекту заповнювали лічильну камеру через зазор під покривним склом. Оцінку та підрахунок клітин проводили під світловим мікроскопом при збільшенні $\times 100$ або $\times 400$. Підрахунок здійснювали у 4 великих квадратах камери (кожен великий квадрат складається з 16 маленьких). Щоб уникнути подвійного врахування клітин на межах квадратів, дотримувалися правила Мішера: враховували клітини всередині квадрата, а також ті, що лежать на його верхній та лівій лініях (клітини на нижній та правій лініях не враховували). Під час мікроскопії розділяли клітини на дві категорії:

живі спленоцити — круглі, прозорі, з характерним блиском (рефрактерністю) та мертві спленоцити — матові, чітко забарвлені у синій колір.

Формули та математичні розрахунки. Концентрацію живих клітин у вихідній суспензії розраховували за формулою:

$$C = \frac{N \times Df \times 10^4}{n}$$

Де: C — концентрація клітин (кількість клітин / мл); N — сумарна кількість підрахованих (живих) клітин у квадратах; Df — коефіцієнт розведення барвником; n — кількість великих квадратів, у яких проводився підрахунок (зазвичай n = 4); (10⁴) — постійний коефіцієнт перерахунку об'єму одного великого квадрата (0,1 мм³ або 10⁻⁴мл) до об'єму 1 мл.

Якщо у 4 великих квадратах було підраховано 160 живих спленоцитів:

$$C = \frac{160 \times 2 \times 10^4}{4} = 80 \times 10^4 = 8 \times 10^5 \text{ клітин/мл}$$

Якщо всього у нас було 10 мл робочого середовища, у якому ресуспендували осад спленоцитів після відмивання то відповідно отримане число помножили на 10 і отримали загальну кількість спленоцитів у досліджуваній суспензії.

2.7. Визначення рівнів ключових цитокінів

Визначення рівня ФНП-α

Рівень ФНП-α визначали за допомогою комерційної тест-системи BD OptEIA Set Mouse TNF-α (BD Biosciences, США) згідно інструкції. В лунки 96-луночного планшету вносили антимишачі антитіла проти ФНП-α (у розведенні 1:250), інкубували 12-18 год при +2-+6⁰С. По закінченню інкубації тричі промивали дистильованою водою, вносили по 200 мкл розчину фосфатного буферу з 10% фетальної сироватки телят (рН 7,0) та інкубували 1 год при

кімнатній температурі. Потім знову тричі промивали дистильованою водою, вносили по 100 мкл досліджуваних зразків спленоцитів, інкубували 2 год. при кімнатній температурі. Згодом промивали дистильованою водою 5 разів, вносили по 100 мкл робочого розчину біотинізованих антимишачих антитіл проти ФНП- α (розведення 1:500) та кон'югованого з стрептавідином ферменту (пероксидаза хрину), інкубували 1 год. при кімнатній температурі. І на останньому етапі промивали 7 разів, вносили по 100 мкл субстрату, інкубували 30 хв. в темному місці при кімнатній температурі. В кожну лунку додавали 50 мкл стоп-розчину. Вимірювання оптичної густини проводили при $\lambda=450$ нм проти $\lambda=570$ нм на автоматичному рідері StatFax 2100 (США). Рівень ФНП- α в пг/мл в сироватці крові мишей визначали за допомогою калібрувальної кривої.

Визначення рівня ІЛ-10

Рівень ІЛ-10 визначали за допомогою комерційної тест-системи BD OptEIA Set Mouse IL-10 (BD Biosciences, США) згідно інструкції. Постановку реакції, а також облік результатів проводили як описано вище при визначенні рівня ФНП- α . Слід відмітити, що розведення біотинізованих антимишачих антитіл проти ІЛ-10 було 1:250.

Визначення рівня ІЛ-4

Рівень ІЛ-4 визначали за допомогою комерційної тест-системи BD OptEIA Set Mouse IL-4 (BD Biosciences, США) згідно інструкції до набору. В лунки 96-луночного планшету вносили антимишачі антитіла проти ІЛ-4 (у розведенні 1:250), інкубували 12-18 год при +2-+6о С. По закінченню інкубації тричі промивали дистильованою водою, вносили по 200 мкл розчину фосфатного буферу з 10% фетальної сироватки телят (рН 7,0), інкубували 1 год при кімнатній температурі. Опісля промивали в дистильованій воді, вносили по 100 мкл досліджуваних зразків спленоцитів, інкубували 2 години при кімнатній температурі. Промивали знову дистильованою водою 5 разів, вносили по 100 мкл робочого розчину біотинізованих антимишачих антитіл проти ІЛ-4

(розведення 1:500) та кон'югованого з стрептавідином ферменту (пероксидаза хрину) інкубували 1 год при кімнатній температурі. На останньому етапі знову промивали дистильованою водою 7 разів, вносили по 100 мкл субстрату, інкубували 30 хв. в темному місці при кімнатній температурі. В кожному лунку додавали 50 мкл стоп-розчину. Вимірювання оптичної густини проводили при $\lambda=450$ нм проти $\lambda=570$ нм на автоматичному рідері StatFax 2100 (США). Рівень ІЛ-4 в пг/мл в сироватці крові мишей визначали за допомогою калібрувальної кривої.

Визначення рівня ІФН- γ

Рівень ІФН- γ визначали за допомогою комерційної тест-системи BD OptEIA Set Mouse IFN- γ (BD Biosciences, США) згідно інструкції. Постановку реакції, а також облік результатів проводили як описано вище при визначенні рівня ІЛ-4. Слід відмітити, що розведення біотинізованих антимишачих антитіл проти ІФН- γ було 1:250.

2.1.10 Статистичний аналіз

Статистичний аналіз результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Для оцінки рівнів значимості відмінностей середніх значень між групами застосовували t-критерій Ст'юдента.

t-критерій Ст'юдента — це статистичний метод, який використовують для оцінки достовірності різниці між середніми значеннями двох вибірок. Дозволяє визначити, чи є різниця між групами випадковою чи статистично значущою. t-критерій використовувався для: порівняння рівнів цитокінів у групах; оцінки різниці об'єму/маси пухлини; підтвердження ефективності пробіотиків.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою непараметричного U-критерію Mann-Whitney, кореляційний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Prism 8.0. Достовірними вважали відмінності з вірогідністю не менше 95% ($p < 0,05$).

Розділ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Експериментальне дослідження впливу *Bifidobacterium lactis* BB12 та *Lactobacillus rhamnosus* GG на цитокіновий профіль мишей з модельним пухлинним процесом

3.1. Вплив *B. lactis* BB12 та *L. rhamnosus* GG на рівень продукції ряду прозапальних і протизапальних цитокінів у інтактних мишей лінії Balb/c

Першим етапом нашого дослідження було визначення рівнів цитокінів, продукованих макрофагами (IL-10, TNF- α) та лімфоцитами (IL-4, IFN- γ) селезінки мишей без пухлин, яким протягом 28 діб перорально вводили *B. lactis* BB12 або *L. rhamnosus* GG.

Тривале введення інтактним мишам *B. lactis* BB12 не мало суттєвого впливу на продукцію досліджуваних цитокінів (рис.3.1). Відмічали лише незначне підвищення рівня продукції TNF- α (в 1,1 раза, $p > 0,05$) та IFN- γ (в 1,05 раза, $p > 0,05$) порівняно з показниками інтактного контролю. На противагу цьому, в групі мишей, яким вводили *L. rhamnosus* GG, відмічали статистично достовірне ($p < 0,05$) збільшення рівнів прозапальних цитокінів: вміст TNF- α складав $1164,8 \pm 42,1$ пг/мл проти $970,4 \pm 36,8$ пг/мл в інтактному контролі; вміст IFN- γ становив $2322,9 \pm 77,5$ пг/мл проти $2013,5 \pm 34,2$ пг/мл у нелікованих мишей.

Незалежно від того використовували *B. lactis* BB12 або *L. rhamnosus* GG не спостерігали зростання рівнів протизапальних цитокінів IL-10 та IL-4. Вміст IL-10 складав відповідно $887,8 \pm 15,3$ та $845,6 \pm 36,6$ пг/мл (в контрольній групі – $866,4 \pm 25,6$ пг/мл). Вміст IL-4 – відповідно $907,8 \pm 38,7$ та $817,3 \pm 27,1$ пг/мл (в контрольній групі – $804,3 \pm 15,6$ пг/мл).

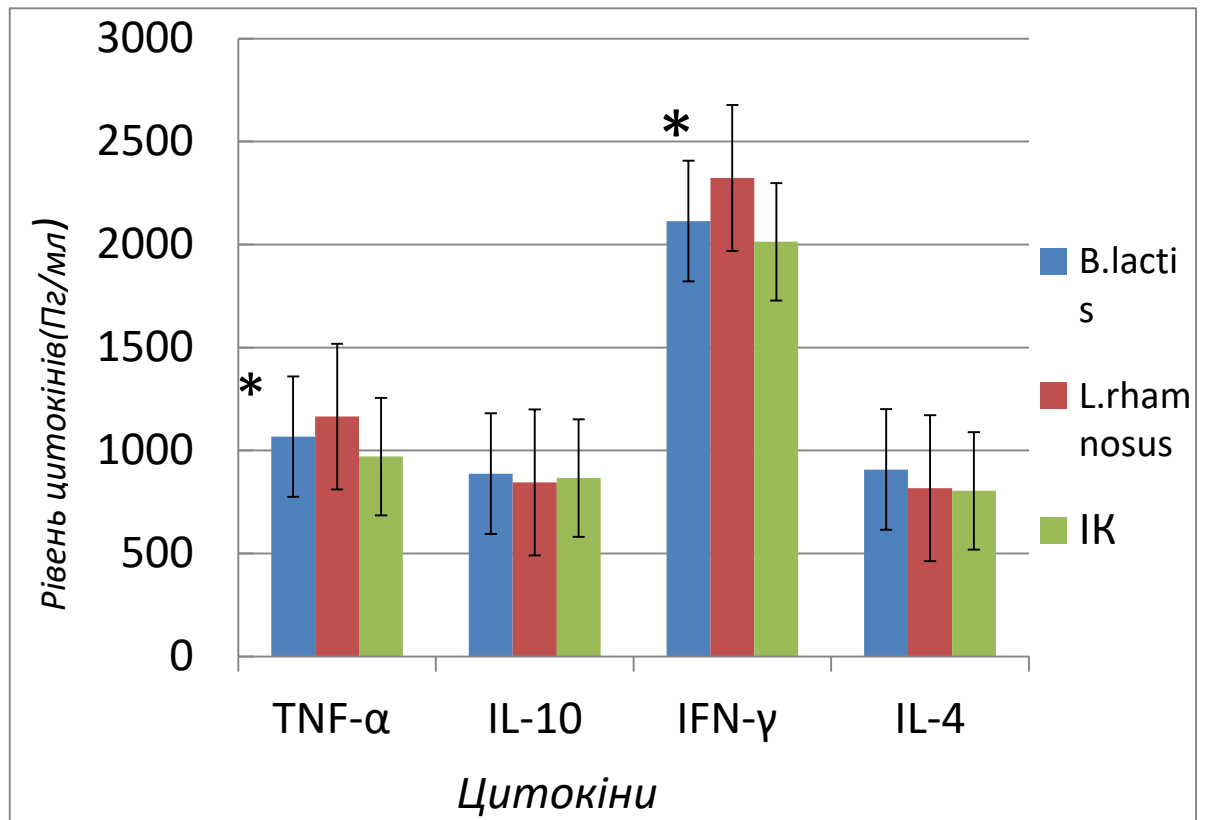


Рис. 3.1. Вплив *B. lactis* BB12 та *L. rhamnosus* GG на продукцію цитокінів макрофагами (TNF-α, IL-10) та лімфоцитами (IFN-γ, IL-4) селезінки.

* – $p < 0,05$ в порівнянні з показниками групи «ІК».

Примітка: *B. animalis*- *Bifidobacterium lactis* Bb12; *L. rhamnosus* GG – *Lactobacillus rhamnosus* GG; ІК-інтактний контроль; TNF-α- фактор некрозу пухлин; IL-10- інтерлейкін-10; IFN-γ- інтерферон-гамма; IL-4- інтерлейкін-4.

Для визначення напрямку імунної відповіді лімфоцитів і макрофагів за рівнем продукованих ними прозапальних та протизапальних цитокінів використовують розрахункові показники - співвідношення TNF-α / IL-10 та IFN-γ / IL-4. В нашому дослідженні за умови введення *B. lactis* BB12 співвідношення TNF-α / IL-10 дорівнювало 1,2 ум.од. та практично не відрізнялось від такого у інтактних мишей (1,1 ум.од), в той час як при введенні *L. rhamnosus* GG - співвідношення TNF-α / IL-10 було вищим і складало 1,4 ум.од. Як відомо, макрофаги поділяються на два типи: M1 – клітини з прозапальними властивостями, які продукують фактори здатні підтримувати

розвиток запального процесу та мають протипухлинний ефект; M2 – клітини з протизапальними властивостями, необхідні для забезпечення процесів репарації, проте за рахунок продукції імуносупресивних факторів сприяють пухлинному росту[71]. Одним із маркерів макрофагів різних типів є продуковані ними цитокіни – для M1 характерною є продукція TNF- α , для M2 – IL-10. Зміни величини співвідношення названих цитокінів порівняно з показником інтактних тварин свідчать про зміни напрямку поляризації макрофагів – до M1 або M2 типу. В нашому дослідженні виявилось, що застосування *L. rhamnosus* GG призвело до превалювання в селезінці мишей макрофагів M1.

Аналогічні результати було отримано і при аналізі величин співвідношення IFN- γ / IL-4, яке використовують для визначення напрямку розвитку імунної відповіді по Th1 або Th2 типу. В групі мишей, яким вводили біфідобактерії рівень IFN- γ / IL-4 складав 2,3 ум.од, лактобактерії – 2,8 ум.од, у інтактних тварин – 2,5 ум.од. Тобто застосування *L. rhamnosus* GG сприяло активації реакцій клітинного імунітету, які відіграють важливу роль для підтримки протипухлинної резистентності.

Таким чином, отримані на першому етапі дослідження дані дозволяють припустити, що застосування саме *L. rhamnosus* GG може сприяти підсиленню протипухлинної імунної відповіді у експериментальних тварин.

3.2. Вплив *B. lactis* BB12 та *L. rhamnosus* GG на рівень продукції ряду прозапальних і протизапальних цитокінів у мишей лінії Balb/c з аденокарциномою Ерліха

Другим етапом нашого дослідження була оцінка впливу *B. lactis* BB12 та *L. rhamnosus* GG на протипухлинну імунну відповідь. Як показали результати дослідження, жодний з використаних бактеріальних препаратів не впливав на частоту прищеплення та латентний період виходу пухлин (табл.3.1).

Таблиця 3.1. Характеристика пухлинного процесу у мишей різних груп

Показник	Група тварин		
	<i>B. lactis</i> BB12	<i>L. rhamnosus</i> GG	КПР
Частота прищеплення АКЕ, %	100	100	100
Латентний період, діб	7,9 ± 0,9	7,5 ± 0,6	8,5 ± 1,0
Розмір первинного пухлинного вузла (мм ³)			
на 14-ту добу	476,4 ± 47,3*	476,4 ± 47,3*	2162,0 ± 232,7
на 28-му добу	2170,4 ± 402,8*	2116,8 ± 549,8*	4074,6 ± 767,0
ІГРП, %			
на 28-му добу	46,7 ± 9,9	48,0 ± 13,5	—

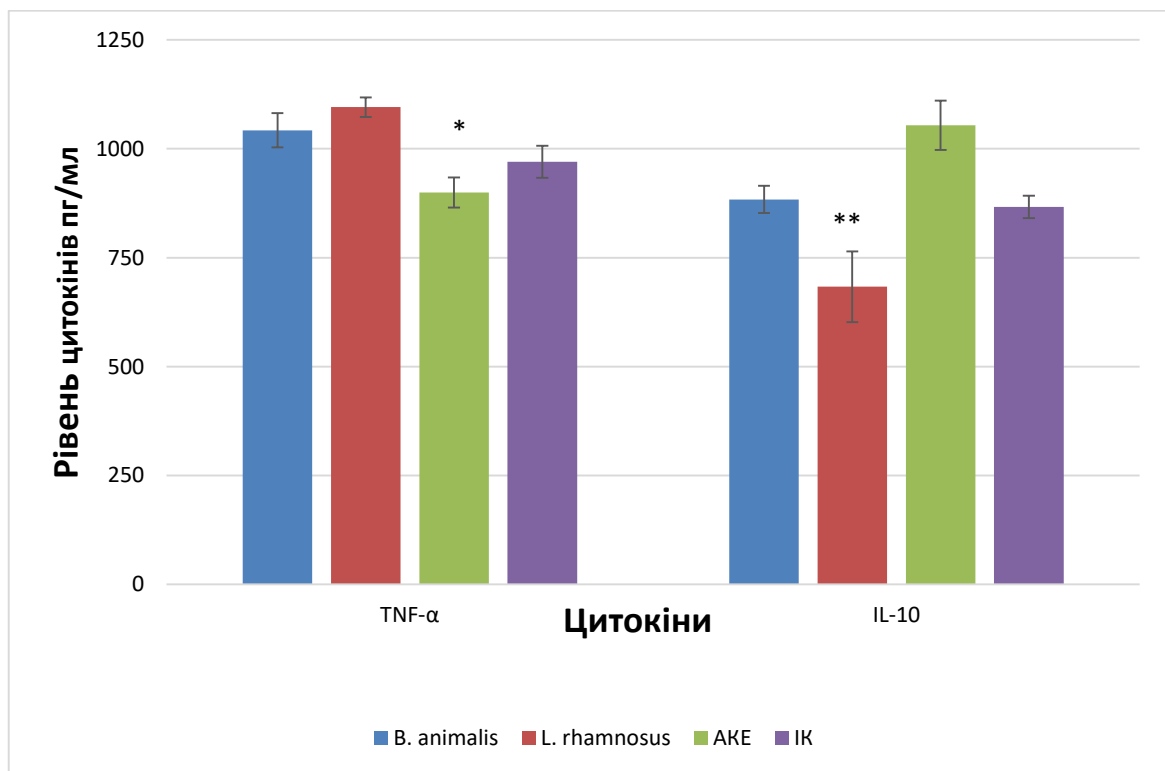
* – $p < 0,05$ при порівнянні з показниками групи «КПР»

Примітка: *B. Lactis* BB12- *Bifidobacterium lactis* BB12; *L. rhamnosus* GG – *Lactobacillus rhamnosus* GG; КПР- контроль пухлинного росту; АКЕ- аденокарцинома Ерліха; ІГРП- індекс гальмування росту пухлини.

Частота прищеплення пухлин у мишей всіх груп складала 100%. Латентний період виходу пухлин після перещеплення клітин АКЕ в середньому складав 8 діб. Проте динаміка росту первинної пухлини у тварин експериментальних та контрольної груп відрізнялась. Найбільш швидкий ріст пухлини відмічали в групі нелікованих мишей. На 14-ту і 28-му доби пухлинного росту розмір первинного пухлинного вузла у тварин цієї групи складав відповідно $2162,0 \pm 232,7$ та $4074,6 \pm 767,0$ мм³. В групах тварин, яким вводили пробіотики ріст пухлини був уповільнений: на 14-ту добу в обох групах розмір первинного пухлинного вузла був меншим за показник групи «КПР» в 4,5 раза ($p < 0,05$), а на 28-му в 1,9 рази ($p < 0,05$).

При проведенні експериментальних досліджень з метою оцінки протипухлинної ефективності засобів різної природи використовують індекс

гальмування росту пухлини (ІГРП, %). Цей показник є розрахунковим і включає в себе порівняння даних щодо розміру пухлин у тварин контрольної та дослідних груп. Протипухлинний ефект препаратів вважається досягнутим за умови, якщо розрахований ІГРП перевищує 50,0% [102]. В нашому дослідженні при застосуванні *B. animalis* BB12 ІГРП складав 46,7%; при застосуванні *L. rhamnosus* GG ІГРП складав 48,0% (див. табл. 3.1). Таким чином, хоча введення *B. animalis* BB12 та *L. rhamnosus* GG супроводжувалось гальмуванням росту первинної пухлини, проте жоден з досліджуваних препаратів не мав безпосередньої протипухлинної ефективності. Продемонстроване уповільнення пухлинного росту може бути обумовлене активацією протипухлинної імунної відповіді внаслідок введення мікробних препаратів.



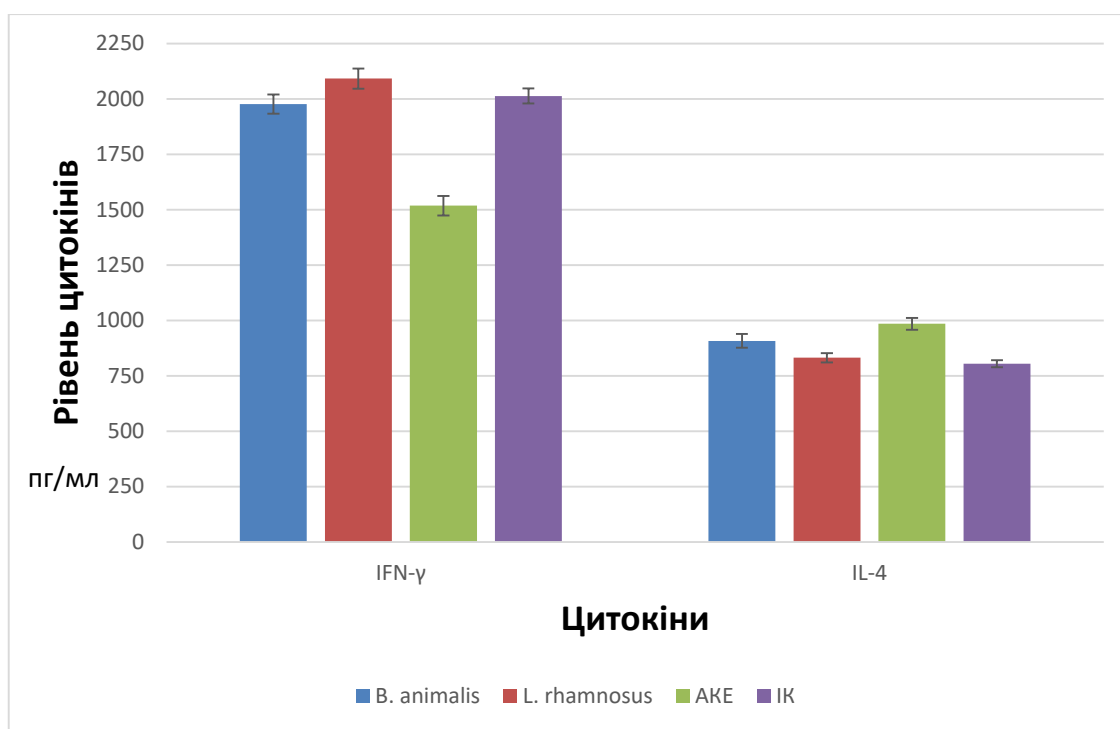


Рис 3.2. Рис 3.3 Вплив *B. lactis* BB12 та *L. rhamnosus* GG на продукцію цитокінів клітинами селезінки мишей з аденокарциномою Ерліха.

Примітка: *B. animalis*- *Bifidobacterium lactis* Bb12; *L. rhamnosus* GG – *Lactobacillus rhamnosus* GG; АКЕ- миші з аденокарциномою Ерліха; ІК- інтактний контроль; TNF-α- фактор некрозу пухлин; IL-10- інтерлейкін-10; IFN-γ- інтерферон-гамма; IL-4- інтерлейкін-4.

Таблиця 3.2. Вміст цитокінів (пг/мл) в супернатантах спленоцитів мишей з пухлинами

	<i>B. animalis</i>	<i>L. rhamnosus</i>	АКЕ	ІК
TNF-α	1042,4±39,2**	1095,5±22,3*/**	899,4±34,5*	970,4±36,8
IL-10	883,8±31,1**	683,4±81,1**	1053,7±56,6*	866,4±25,6
TNF-α / IL-10	1,2	1,6	0,9	1,1
IFN-γ	1976,8±43,7**	2092,2±45,5*/**	1518,2±43,7*	2013,5±34,2
IL-4	907,8±31,1*/**	831,6±21,1**	984,7±26,6*	804,3±15,6
IFN-γ / IL-4	2,2	2,5	1,5	2,5

* – $p < 0,05$ при порівнянні з показниками групи «ІК»; ** – $p < 0,05$ при порівнянні з показниками групи «АКЕ».

Примітка: *B. animalis*- *Bifidobacterium lactis* Bb12; *L. rhamnosus* GG – *Lactobacillus rhamnosus* GG; АКЕ- миші з аденокарциномою Ерліха; ІК- інтактний контроль; TNF- α - фактор некрозу пухлин; IL-10- інтерлейкін-10; IFN- γ - інтерферон-гамма; IL-4- інтерлейкін-4.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що введення пробіотичних штамів *B. animalis subsp. lactis* BB-12 та *L. rhamnosus* GG суттєво впливало на продукцію про- та протизапальних цитокінів у мишей з модельним пухлинним процесом. Аналіз вмісту цитокінів у супернатантах спленоцитів показав модифікацію імунної відповіді залежно від застосованого пробіотика.

Рівень TNF- α у групі мишей, які отримували *B. animalis*, становив $1042,4 \pm 39,2$ пг/мл, що було достовірно вищим порівняно з групою АКЕ ($899,4 \pm 34,5$ пг/мл). Найвищі значення TNF- α спостерігались у групі *L. rhamnosus* — $1095,5 \pm 22,3$ пг/мл. У групі інтактного контролю показник становив $970,4 \pm 36,8$ пг/мл. Отримані результати свідчать про активацію прозапальної ланки імунної відповіді під впливом пробіотичних препаратів.

Водночас рівень протизапального цитокіну IL-10 у групах, що отримували пробіотики, мав тенденцію до зниження. Так, у мишей групи *B. animalis* концентрація IL-10 становила $883,8 \pm 31,1$ пг/мл, а у групі *L. rhamnosus* — $683,4 \pm 81,1$ пг/мл, що було нижче порівняно з групою АКЕ ($1053,7 \pm 56,6$ пг/мл). У інтактних тварин рівень IL-10 дорівнював $866,4 \pm 25,6$ пг/мл. Зниження IL-10 може свідчити про послаблення імуносупресивних механізмів у пухлинному мікрооточенні.

Співвідношення TNF- α /IL-10 також відображало зміщення імунної відповіді у бік прозапальної активності. У групі АКЕ цей показник становив 0,9, тоді як після введення *B. animalis* зростав до 1,2, а після введення *L. rhamnosus* — до 1,6. У інтактному контролі співвідношення дорівнювало 1,1.

Аналіз продукції IFN- γ показав, що застосування пробіотиків супроводжувалося підвищенням рівня даного цитокіну. У групі *B. animalis* рівень IFN- γ становив $1976,8 \pm 43,7$ пг/мл, а у групі *L. rhamnosus* — $2092,2 \pm 45,5$ пг/мл. У мишей з АКЕ без пробіотичної корекції цей показник був достовірно нижчим — $1518,2 \pm 43,7$ пг/мл, тоді як у інтактних тварин — $2013,5 \pm 34,2$ пг/мл. Підвищення IFN- γ може свідчити про активацію клітинної протипухлинної імунної відповіді.

Рівень IL-4 у групі АКЕ становив $984,7 \pm 26,6$ пг/мл і перевищував аналогічний показник інтактного контролю ($804,3 \pm 15,6$ пг/мл). Після введення *B. animalis* рівень IL-4 знижувався до $907,8 \pm 31,1$ пг/мл, а у групі *L. rhamnosus* — до $831,6 \pm 21,1$ пг/мл. Це може свідчити про зменшення активності Th2-асоційованої імунної відповіді.

Співвідношення IFN- γ /IL-4, яке характеризує баланс між Th1- та Th2-типами імунної відповіді, у групі АКЕ становило 1,5. Після застосування *B. animalis* цей показник зростав до 2,2, а у групі *L. rhamnosus* — до 2,5, що відповідало значенням інтактного контролю. Отримані результати свідчать про зміщення імунної відповіді у бік Th1-типу під впливом пробіотичних штамів, особливо *L. rhamnosus* GG, що може бути одним із механізмів їхньої протипухлинної дії.

УЗАГАЛЬНЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

У проведеному дослідженні було оцінено вплив пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB12 та *Lactobacillus rhamnosus* GG на продукцію цитокінів клітинами селезінки та перебіг пухлинного процесу у мишей лінії Balb/c з експериментальною аденокарциномою Ерліха.

На першому етапі дослідження встановлено, що тривале пероральне введення пробіотичних бактерій інтактним мишам не призводило до суттєвих змін продукції протизапальних цитокінів IL-10 та IL-4. Водночас застосування *L. rhamnosus* GG супроводжувалося статистично достовірним підвищенням рівнів прозапальних цитокінів TNF- α та IFN- γ у порівнянні з інтактним контролем, тоді як введення *B. lactis* BB12 викликало лише незначні, статистично недостовірні зміни цих показників. Аналіз співвідношення TNF- α /IL-10, що використовується як індикатор поляризації макрофагів, показав тенденцію до збільшення цього показника при застосуванні *L. rhamnosus* GG, що свідчить про переважання макрофагів M1-типу з прозапальними та потенційно протипухлинними властивостями. Аналогічна тенденція була виявлена при аналізі співвідношення IFN- γ /IL-4, яке характеризує напрямок диференціації Т-хелперної відповіді. Збільшення цього показника при введенні *L. rhamnosus* GG свідчить про активацію імунної відповіді за Th1-типом, що асоціюється з посиленням клітинного імунітету.

На другому етапі дослідження було оцінено вплив пробіотичних штамів на перебіг пухлинного процесу у мишей з аденокарциномою Ерліха. Встановлено, що введення досліджуваних пробіотиків не впливало на частоту прищеплення пухлини та латентний період її розвитку. Проте динаміка росту пухлинного вузла у тварин експериментальних груп істотно відрізнялася від показників контрольної групи пухлинного росту. У мишей, які отримували *B.lactis* BB12 або *L. rhamnosus* GG, спостерігалось достовірне зменшення розмірів пухлинного вузла на 14-ту та 28-му добу пухлинного росту. Розрахований індекс гальмування росту пухлини становив відповідно 46,7 % та

48,0 %, що свідчить про виражену тенденцію до уповільнення пухлинного росту, хоча ці значення не перевищували порогового рівня, який свідчить про безпосередню протипухлинну ефективність препаратів.

Дослідження цитокінового профілю спленоцитів мишей з пухлинами показало, що розвиток пухлинного процесу супроводжується зниженням продукції прозапальних цитокінів TNF- α та IFN- γ і підвищенням рівня протизапального цитокіну IL-10, що може свідчити про формування імуносупресивного мікрооточення пухлини. Введення пробіотичних препаратів сприяло частковій нормалізації цих показників. Зокрема, у тварин, які отримували *L. rhamnosus* GG, спостерігалось підвищення рівнів TNF- α та IFN- γ і зниження продукції IL-10 у порівнянні з групою нелікованих мишей з пухлинами. Це супроводжувалося зростанням співвідношень TNF- α /IL-10 та IFN- γ /IL-4, що свідчить про активацію макрофагів M1-типу та імунної відповіді за Th1-типом. Подібні, хоча менш виражені зміни відзначалися і при застосуванні *B. animalis* BB12.

Таким чином, результати проведеного дослідження свідчать, що пробіотичні штами *B. animalis* BB12 та *L. rhamnosus* GG здатні модулювати імунну відповідь організму експериментальних тварин. Найбільш виражений імуномодулюючий ефект спостерігався при застосуванні *L. rhamnosus* GG, що проявлялося активацією прозапальних механізмів, поляризацією макрофагів у напрямку M1-фенотипу та стимуляцією клітинної імунної відповіді за Th1-типом. Виявлені зміни супроводжувалися уповільненням росту експериментальної пухлини, що може свідчити про опосередкований протипухлинний ефект пробіотичних мікроорганізмів, реалізований через механізми імунної регуляції.

ВИСНОВКИ

1. У ході експериментальних досліджень встановлено, що тривале пероральне введення пробіотичного штаму *B. lactis* BB12 інтактним мишам не супроводжувалося статистично достовірними змінами рівнів досліджуваних цитокінів. Спостерігалася лише тенденція до незначного підвищення продукції прозапальних цитокінів ФНП- α та ІФН- γ у порівнянні з показниками інтактного контролю, що свідчить про відсутність вираженої активації імунної відповіді за умов фізіологічного стану організму. Водночас застосування *L. rhamnosus* GG у інтактних мишей призводило до достовірного підвищення рівнів прозапальних цитокінів ФНП- α та ІФН- γ , що свідчить про стимуляцію функціональної активності клітин вродженого та адаптивного імунітету.
2. Аналіз цитокінового профілю спленоцитів мишей з пухлинами показав, що розвиток пухлинного процесу супроводжувався суттєвими змінами у функціонуванні імунної системи. Зокрема, у нелікованих тварин спостерігалось зниження рівнів прозапальних цитокінів ФНП- α та ІФН- γ та підвищення продукції протизапального цитокіну ІЛ-10, що може свідчити про формування імуносупресивного мікрооточення, характерного для пухлинного росту. Такі зміни сприяють пригніченню ефекторних механізмів клітинного імунітету та створюють сприятливі умови для прогресування пухлини.
3. Введення пробіотичних препаратів сприяло частковій корекції виявлених порушень цитокінового балансу. У мишей, які отримували *B. lactis* BB12, спостерігалось підвищення продукції ФНП- α та ІФН- γ і зниження рівня ІЛ-10 у порівнянні з тваринами контрольної групи пухлинного росту, що супроводжувалося збільшенням співвідношення ФНП- α /ІЛ-10. Проте найбільш виражені зміни цитокінового профілю були характерні для групи мишей, яким вводили *L. rhamnosus* GG. У цих тварин відзначалося

більш значне підвищення рівнів ФНП- α та ІФН- γ , а також зниження продукції ІЛ-10.

4. Таким чином, результати проведеного дослідження показали, що пробіотичні штами *B. animalis* BB12 та *L. rhamnosus* GG здатні модулювати цитокіновий профіль клітин імунної системи експериментальних тварин. Найбільш виражений імуномодулюючий ефект серед досліджених штамів продемонстрував *Lactobacillus rhamnosus* GG, який сприяв активації прозапальних механізмів імунної відповіді.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA by Members of EFSA // *EFSA Journal*. 2007. Vol. 5, No. 12. P. 587.
2. Al-Najjar M. A. A., Abdulrazzaq S. B., Alzaghari L. F. at al. Evaluation of immunomodulatory potential of probiotic conditioned medium on murine macrophages // *Scientific Reports*. 2024. Vol. 14. P. 126.
3. Amedei A., Morbidelli L. Circulating metabolites originating from gut microbiota control endothelial cell function // *Molecules*. 2019. Vol. 24. P. 3992.
4. Ardita C. S., Mercante J. W., Kwon Y. M. at al. Epithelial adhesion mediated by pilin SpaC is required for *Lactobacillus rhamnosus* GG-induced cellular responses // *Applied and Environmental Microbiology*. 2014. Vol. 80, No. 16. P. 5068–5077.
5. Ashraf R., Shah N. P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014. Vol. 54, No. 7. P. 938–956.
6. Avlami A., Kordossis T., Vrizidis N. at al. *Lactobacillus rhamnosus* endocarditis complicating colonoscopy // *Journal of Infection*. 2001. Vol. 42, No. 4. P. 283–285.
7. Badgeley A., Anwar H., Modi K. at al. Effect of probiotics and gut microbiota on anti-cancer drugs: mechanistic perspectives // *Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Cancer*. 2021. Vol. 1875. P. 188494.
8. Banna G. L. at al. Microbiota modulation with probiotics in cancer therapy: impact on cytokine regulation // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2020.
9. Cai Q., Li Y., Pei G. Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* attenuate microglia-mediated neuroinflammation and modulate microglial phagocytosis

- and behavioural response // *Journal of Neuroinflammation*. 2017. Vol. 14, No. 1. P. 63.
- 10.Chen J. S., Faller D. V., Spanjaard R. A. Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: Promising anticancer therapeutics? // *Current Cancer Drug Targets*. 2003. Vol. 3. P. 219–236.
 - 11.Chen S., Saeed A. F., Liu Q. at al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023. Vol. 8, No. 1. P. 207.
 - 12.Chen X., Yang G., Song J.-H. at al. Probiotic yeast inhibits VEGFR signaling and angiogenesis in intestinal inflammation // *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8. P. e64227.
 - 13.Combination of the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 reduces inflammation markers in elderly residents: results of PRINCESS trial // *Frontiers in Immunology*. 2021.
 - 14.Conway P. L., Gorbach S. L., Goldin B. R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells // *Journal of Dairy Science*. 1987. Vol. 70, No. 1. P. 1–12.
 - 15.de Vrese M., Laue C., Papazova E. at al. Impact of oral administration of four *Lactobacillus* strains on Nugent score: systematic review and meta-analysis // *Beneficial Microbes*. 2019. Vol. 10, No. 5. P. 483–496.
 - 16.Denkova R., Goranov B., Teneva D. at al. Antimicrobial activity of probiotic microorganisms: mechanisms of interaction and methods of examination // *Antimicrobial Research: Novel Bioknowledge and Educational Programs*. 2017. Vol. 1. P. 201–212.
 - 17.Dos Reis S. A., da Conceição L. L., Siqueira N. P. at al. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer // *Nutrition Research*. 2017. Vol. 37. P. 1–19.
 - 18.Dubey V., Ghosh A. Probiotics cross talk with multi cell signaling in colon carcinogenesis // *Journal of Probiotics and Health*. 2013. Vol. 1. P. 2–5.

19. Escamilla J., Lane M. A., Maitin V. Cell-free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion in vitro // *Nutrition and Cancer*. 2012. Vol. 64. P. 871–878.
20. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes ETS No. 123. Strasbourg, 1986.
21. Fernández J., Redondo-Blanco S., Gutiérrez-del-Río I. et al. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: a review // *Journal of Functional Foods*. 2016. Vol. 25. P. 511–522.
22. Fijan S., Šulc D., Steyer A. Study of the in vitro antagonistic activity of various single-strain and multi-strain probiotics against *Escherichia coli* // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018. Vol. 15. P. 1539.
23. Fong F. L. Y., Kirjavainen P. V., El-Nezami H. Immunomodulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived soluble factors on antigen-presenting cells of healthy blood donors // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. P. 22845.
24. Fong W., Li Q., Yu J. Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer // *Oncogene*. 2020. Vol. 39. P. 4925–4943.
25. Gao H., Li X., Chen X. et al. The functional roles of *Lactobacillus acidophilus* in different physiological and pathological processes // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022. Vol. 32. P. 1226.
26. Garrett W. S. Cancer and the microbiota // *Science*. 2015. Vol. 348, No. 6230. P. 80–86.
27. Garrigues C., Johansen E., Pedersen M. B. Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12, a widely consumed probiotic strain // *Journal of Bacteriology*. 2010. Vol. 192, No. 9. P. 2467–2468.
28. Gayathri D., Rashmi B. Anti-cancer properties of probiotics: a natural strategy for cancer prevention // *EC Nutrition*. 2016. Vol. 5. P. 1191–1202.

29. Genua F., Raghunathan V., Jenab M. et al. The role of gut barrier dysfunction and microbiome dysbiosis in colorectal cancer development // *Frontiers in Oncology*. 2021. Vol. 11. P. 626349.
30. Gilad O., Svensson B., Viborg A. H. et al. The extracellular proteome of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 reveals proteins with putative roles in probiotic effects // *Proteomics*. 2011. Vol. 11. P. 2503–2514.
31. Gorini F., Tonacci A. Tumor microbial communities and thyroid cancer development — the protective role of antioxidant nutrients // *Antioxidants*. 2023. Vol. 12. P. 1898.
32. Górská A., Przystupski D., Niemczura M. J. et al. Probiotic bacteria: a promising tool in cancer prevention and therapy // *Current Microbiology*. 2019. Vol. 76. P. 939–949.
33. Gunaratnam S., Millette M., McFarland L. V. et al. Potential role of probiotics in reducing *Clostridioides difficile* virulence: interference with quorum sensing systems // *Microbial Pathogenesis*. 2021. Vol. 153. P. 104798.
34. Guo N., Lv L. L. Mechanistic insights into the role of probiotics in modulating immune cells in ulcerative colitis // *Immunity, Inflammation and Disease*. 2023. Vol. 11, No. 10. P. e1045.
35. Hasan N., Yang H. J. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation // *PeerJ*. 2019. Vol. 7. P. e7502.
36. Hibberd A. A. et al. The effects of prolonged consumption of probiotic milk containing *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium lactis* BB-12 on systemic immunity in the elderly // *British Journal of Nutrition*. 2017.
37. Hill C., Guarner F., Reid G. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014. Vol. 11, No. 8. P. 506–514.
38. Ishikawa H. Immunomodulation by *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 // *Journal of Applied Microbiology*. 2021.

39. Jungersen M., Wind A., Johansen E. et al. The science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 // *Microorganisms*. 2014. Vol. 2. P. 92–110.
40. Kaczmarczyk M., Szulińska M., Łoniewski I. et al. Treatment with multi-species probiotics changes the functions, not the composition of gut microbiota in postmenopausal women with obesity // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022. Vol. 12. P. 815798.
41. Kankainen M., Paulin L., Tynkkynen S. et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2009. Vol. 106, No. 40. P. 17193–17198.
42. Kekkonen R. A. *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived soluble mediators modulate adaptive immune responses // *Clinical and Experimental Immunology*. 2018.
43. Klaassen C. D., Cui J. Y. Mechanisms of how the intestinal microbiota alters the effects of drugs and bile acids // *Drug Metabolism and Disposition*. 2015. Vol. 43. P. 1505–1521.
44. Knasmüller S., Steinkellner H., Hirschl A. M. et al. Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines // *Mutation Research*. 2001. Vol. 480. P. 129–138.
45. Kobayashi J. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of N-nitroso compounds: a review // *Nitric Oxide*. 2018. Vol. 73. P. 66–73.
46. Konopelnuk V. I., Kompanets I. V., Svyatetska V. M. et al. Functional polarization of macrophages of rats with progesterone-induced obesity treated with melanin from the Antarctic yeast *Nadsoniella nigra* // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. Vol. 10, No. 4. P. 538–543.
47. Kristensen N. B., Bryrup T., Allin K. H. et al. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic

- review of randomized controlled trials // *Genome Medicine*. 2016. Vol. 8. P. 1–11.
- 48.Kumar M., Kumar A., Nagpal R. at al. Cancer-preventing attributes of probiotics: an update // *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2010. Vol. 61. P. 473–496.
- 49.Kumar M., Nagpal R., Verma V. at al. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer // *Nutrition Reviews*. 2013. Vol. 71. P. 23–34.
- 50.Lactobacillus rhamnosus GG treatment improves intestinal expression of pro-inflammatory cytokines and anti-inflammatory mediators in animal models // *PMC Article*.
- 51.Lactobacillus rhamnosus GG orchestrates an antitumor immune response // *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2021.
- 52.LeBlanc A. M., Perdigón G. Reduction of β -glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model // *Biocell*. 2005. Vol. 29. P. 15–24.
- 53.Lee S. Y., Kang J. H., Kim J. H. at al. Relationship between gut microbiota and colorectal cancer: probiotics as a potential strategy for prevention // *Food Research International*. 2022. Vol. 156. P. 111327.
- 54.Licitra G., Carpino S. The microfloras and sensory profiles of selected protected designation of origin Italian cheeses // *Cheese and Microbes*. 2014. Vol. 2. P. 151–165.
- 55.Liotti F., Marotta M., Sorriento D. at al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG restrains the angiogenic potential of colorectal carcinoma cells // *Molecular Oncology*. 2022. Vol. 16. P. 2959–2980.
- 56.Liu C., Fu L., Wang Y. at al. Influence of the gut microbiota on immune cell interactions and cancer treatment // *Journal of Translational Medicine*. 2024. Vol. 22. P. 939.

- 57.Liu H., Yu Y., Dong A. at al. Emerging strategies for combating *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer treatment: systematic review // *Exploration*. 2023. P. 20230092.
- 58.Liu J., Chen X., Zhou X. at al. *Lactobacillus fermentum* ZS09 mediates epithelial–mesenchymal transition by regulating Wnt/ β -catenin signaling // *Journal of Inflammation Research*. 2021. Vol. 14. P. 7281–7293.
- 59.Liu J., Liu C., Yue J. Radiotherapy and the gut microbiome: facts and fiction // *Radiation Oncology*. 2021. Vol. 16. P. 9.
- 60.Louis P., Hold G. L., Flint H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer // *Nature Reviews Microbiology*. 2014. Vol. 12. P. 661–672.
- 61.Ma W., Mao Q., Xia W. at al. Gut microbiota shapes the efficiency of cancer therapy // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 1050.
- 62.Mangrolia U., Osborne J. W. Probiotics in counteracting the role of neutrophils in cancer metastasis // *Vaccines*. 2021. Vol. 9. P. 1306.
- 63.Markowiak P., Śliżewska K. Administration of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12: immune modulation and health benefits // *Frontiers in Microbiology*. 2023.
- 64.Markowiak P., Śliżewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health // *Nutrients*. 2017. Vol. 9, No. 9. P. 1021.
- 65.Masco L., Ventura M., Zink R. at al. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004. Vol. 54. P. 1137–1143.
- 66.Mego M., Holec V., Drgona L. at al. Probiotics in oncology: review // *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2013. Vol. 47. P. 88–92.
- 67.Merenstein D. J., Tan T. P., Molokin A. at al. Safety of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12-supplemented yogurt // *Gut Microbes*. 2015. Vol. 6, No. 1. P. 66–77.
- 68.Mirzaei R., Afaghi A., Babakhani S. at al. Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021. Vol. 139. P. 111619.

- 69.Mittal V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis // *Annual Review of Pathology*. 2018. Vol. 13. P. 395–412.
- 70.Molska M., Reguła J. Potential mechanisms of probiotics action in the prevention and treatment of colorectal cancer // *Nutrients*. 2019. Vol. 11. P. 2453.
- 71.Mosser D. M., Hamidzadeh K., Goncalves R. Macrophages and the maintenance of homeostasis // *Cellular and Molecular Immunology*. 2021. Vol. 18. P. 579–587.
- 72.Motevaseli E., Dianatpour A., Ghafouri-Fard S. The role of probiotics in cancer treatment: emphasis on their in vivo and in vitro anti-metastatic effects // *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 2017. Vol. 6. P. 66.
- 73.Nakkarach A., Foo H. L., Song A. A.-L. at al. Anti-cancer and anti-inflammatory effects elicited by short chain fatty acids produced by *Escherichia coli* isolated from healthy human gut microbiota // *Microbial Cell Factories*. 2021. Vol. 20. P. 1–17.
- 74.Nowak A., Paliwoda A., Błasiak J. Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019. Vol. 59. P. 3456–3467.
- 75.Ocvirk S., O’Keefe S. J. Influence of bile acids on colorectal cancer risk // *Current Nutrition Reports*. 2017. Vol. 6. P. 315–322.
- 76.Osterlund P., Ruotsalainen T., Korpela R. at al. *Lactobacillus* supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer // *British Journal of Cancer*. 2007. Vol. 97, No. 8. P. 1028–1034.
- 77.Ouwehand A. at al. Understanding the role of gut microflora *Bifidobacterium* in cancer // *Frontiers in Oncology*. 2021.
- 78.Ouwehand A. C., Salminen S., Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002. Vol. 82. P. 279–289.
- 79.Palaria A., Johnson-Kanda I., O’Sullivan D. J. Effect of a synbiotic yogurt on levels of fecal bifidobacteria, clostridia, and enterobacteria // *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. Vol. 78, No. 4. P. 933–940.

80. Peterson L. W., Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis // *Nature Reviews Immunology*. 2014. Vol. 14. P. 141–153.
81. Plaza-Diaz J. at al. Mechanisms of action of probiotics in cancer prevention and treatment // *Nutrients*. 2019.
82. Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda F. J., Gil-Campos M., Gil A. Mechanisms of action of probiotics // *Advances in Nutrition*. 2019. Vol. 10. P. S49–S66.
83. Radulski D. R., Stipp M. C., Galindo C. M., Acco A. Features and applications of Ehrlich tumor model in cancer studies // *Translational Breast Cancer Research*. 2023. Vol. 4. P. 22.
84. Rafter J. at al. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients // *American Journal of Clinical Nutrition*. 2007.
85. Rafter J. J. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention // *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1995. Vol. 30. P. 497–502.
86. Rahman M. M., Islam M. R., Shohag S. at al. Microbiome in cancer: role in carcinogenesis and therapeutic strategies // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022. Vol. 149. P. 112898.
87. Redman M. G., Ward E. J., Phillips R. S. The efficacy and safety of probiotics in people with cancer // *Annals of Oncology*. 2014. Vol. 25, No. 10. P. 1919–1929.
88. Reiner N. E. Macrophages and dendritic cells: methods and protocols // *Methods in Molecular Biology*. 2009. Vol. 531. P. v–vi.
89. Ridlon J. M., Kang D.-J., Hylemon P. B. at al. Gut microbiota and bile acid metabolism // *Digestive Diseases*. 2015. Vol. 33. P. 338–345.
90. Rizzardini G., Eskesen D., Calder P. C. at al. Evaluation of immune benefits of probiotic strains *Bifidobacterium animalis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* // *British Journal of Nutrition*. 2012. Vol. 107, No. 6. P. 876–884.
91. Rose E. C., Odle J., Blikslager A. T. at al. Probiotics, prebiotics and epithelial tight junctions // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. P. 6729.

- 92.Saarela M., Maukonen J., von Wright A. at al. Tetracycline susceptibility of probiotic strains // *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007. Vol. 29, No. 3. P. 271–280.
- 93.Saito S., Okuno A., Peng Z. at al. Probiotic lactic acid bacteria promote anti-tumor immunity // *Frontiers in Immunology*. 2024. Vol. 15. P. 1335975.
- 94.Sankarapandian V., Venmathi Maran B. A., Rajendran R. L. at al. Effectiveness of probiotics in cancer prevention and treatment // *Life*. 2022. Vol. 12. P. 59.
- 95.Schwab C. E., Huber W. W., Parzefall W. at al. Compounds inhibiting carcinogenic effects of heterocyclic amines // *Critical Reviews in Toxicology*. 2000. Vol. 30. P. 1–69.
- 96.Segers M. E., Lebeer S. Molecular mechanisms of *Lactobacillus rhamnosus* GG interaction with host // *Microorganisms*. 2023.
- 97.Sehrawat N., Yadav M., Singh M. at al. Probiotics in microbiome ecological balance against cancer // *Seminars in Cancer Biology*. 2021. Vol. 70. P. 24–36.
- 98.Senan S., Prajapati J. B., Joshi C. G. at al. Gut microbiome composition and probiotic response // *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 6. P. 944.
- 99.Seshadri S., Gajjar D., Joshi A. at al. Role of gut microbiota on drug response and toxicity // *Journal of Toxicological Studies*. 2024. Vol. 2. P. 1252.
100. Sharma M., Arora I., Stoll M. L. at al. Nutritional impact on gut microbiota and cancer prevention // *PLoS ONE*. 2020. Vol. 15. P. e0234893.
101. Si W. at al. *Lactobacillus rhamnosus* GG induces cGAS/STING-dependent interferon response // *Gut*. 2022.
102. Silva M., Jacobus N. V., Deneke C., Gorbach S. L. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1987. Vol. 31, No. 8. P. 1231–1233.
103. Sivaprakasam S., Prasad P. D., Singh N. Benefits of short-chain fatty acids in inflammation and carcinogenesis // *Pharmacology & Therapeutics*. 2016. Vol. 164. P. 144–151.

104. Śliżewska K., Markowiak-Kopeć P., Śliżewska W. The role of probiotics in cancer prevention // *Cancers*. 2020. Vol. 13. P. 20.
105. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Київ: Авіценна, 2001.
106. Szajewska H., Chmielewska A., Pieścik-Lech M. at al. Probiotics in prevention of chemotherapy-induced diarrhea // *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2016. Vol. 16, No. 7. P. 831–843.
107. The science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 // *Frontiers in Microbiology*.
108. Türker N., Toh Z. Q., Karagiannis T. C. at al. Anti-inflammatory effects of probiotics and their metabolites // *Molecular Mechanisms and Physiology of Disease*. 2014. P. 127–150.
109. Vahed S. Z., Barzegari A., Saadat Y. R. at al. *Leuconostoc mesenteroides*-derived anticancer pharmaceuticals // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017. Vol. 94. P. 1094–1100.
110. Van de Loosdrecht A. A., Beelen R. H., Ossenkoppele G. J. at al. Tetrazolium-based MTT assay for cytotoxicity // *Journal of Immunological Methods*. 1994. Vol. 174. P. 311–320.
111. Vergara D., Simeone P., Damato M. at al. Cancer microbiota and EMT // *Journal of Oncology*. 2019. P. 1253727.
112. Vernazza C. L., Gibson G. R., Rastall R. A. Carbohydrate preference and tolerance in *Bifidobacterium* // *Journal of Applied Microbiology*. 2006. Vol. 100, No. 4. P. 846–853.
113. Vieco-Saiz N., Belguesmia Y., Raspoet R. at al. Benefits of lactic acid bacteria in food-animal production // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 57.
114. Vizioli C. at al. Administration of *Bifidobacterium animalis* BB-12 in children // *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14. P. 1165771.

115. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract // *Applied and Environmental Microbiology*. 2008. Vol. 74, No. 16. P. 4985–4996.
116. Wuyts S., Wittouck S., De Boeck I. at al. Phylogenomics of the *Lactobacillus casei* group // *mSystems*. 2017. Vol. 2. P. e00061-17.
117. Yan M., Man S., Sun B. at al. Gut-liver-brain axis in diseases // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023. Vol. 8. P. 443.
118. Yu L., Liu Y., Wang S. at al. Gut microbiota-bile acid-cholestasis relationship // *Gut Microbes*. 2023. Vol. 15. P. 2181930.
119. Yue Y.-C., Yang B.-Y., Lu J. at al.. *Lactobacillus plantarum* metabolites inhibit cancer metastasis // *Microbial Cell Factories*. 2020. Vol. 19. P. 213.
120. Zhang D. Y., Pan Z. Y., Yu X. K. at al. *Bifidobacterium lactis* BB-12 attenuates macrophage aging // *Journal of Immunology Research*. 2019. P. 4657928.
121. Zhang T., Pan D., Yang Y. at al. *Lactobacillus acidophilus* protein and colon cancer cells // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020. Vol. 68. P. 2639–2647.
122. Zhao C., Chen H., Liang H. at al. *Lactobacillus plantarum* induces macrophage immunity // *Frontiers in Pharmacology*. 2022. Vol. 13. P. 832245.
123. Zhao F., Tie N., Kwok L.-Y. at al. Gut microbiome as biomarker of probiotic response // *Pharmacological Research*. 2024. Vol. 209. P. 107445.
124. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E. at al. Taxonomic revision of the genus *Lactobacillus* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020. Vol. 70. P. 2782–2858.
125. Клаус Дж. Лімфоцити. Методи, 1990. 395 с.